ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Mateo
Vázquez Torres

Tesis doctoral

Estudio neuroanatómico comparado del órgano vomeronasal y del bulbo olfativo accesorio en la fauna salvaje. Análisis de su diversidad morfofuncional mediante la utilización de técnicas inmunohistoquímicas y de reconocimiento de glicoconjugados mediante lectinas

Lugo, 2023

Programa de doctorado en Investigación Básica y Aplicada en Ciencias Veterinarias

TESIS DE DOCTORADO

ESTUDIO NEUROANATÓMICO COMPARADO DEL ÓRGANO VOMERONASAL Y DEL BULBO OLFATIVO ACCESORIO EN LA FAUNA SALVAJE. ANÁLISIS DE SU DIVERSIDAD MORFOFUNCIONAL MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS Y DE RECONOCIMIENTO DE GLICOCONJUGADOS MEDIANTE LECTINAS

Mateo Vázquez Torres

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BÁSICA Y APLICADA EN CIENCIAS VETERINARIAS

LUGO

2023

DECLARACIÓN DEL AUTOR/A DE LA TESIS

D./Dña. **Mateo Vázquez Torres**

Título de la tesis: **Estudio neuroanatómico comparado del órgano vomeronasal y del bulbo olfativo accesorio en la fauna salvaje. Análisis de su diversidad morfofuncional mediante la utilización de técnicas inmunohistoquímicas y de reconocimiento de glicoconjugados mediante lectinas.**

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento y declaro que:

1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
2) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
3) Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.
4) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide la versión impresa con la presentada en formato electrónico.

Y me comprometo a presentar el Compromiso Documental de Supervisión en el caso que el original no esté depositado en la Escuela.

En **Lugo**, **14 de agosto de 2023**.

Fdo: Mateo Vázquez Torres

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

Estudio neuroanatómico comparado del órgano vomeronasal y del bulbo olfativo accesorio en la fauna salvaje. Análisis de su diversidad morfofuncional mediante la utilización de técnicas inmunohistoquímicas y de reconocimiento de glicoconjugados mediante lectinas.

D. Pablo Sánchez Quinteiro

INFORMA/N:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D. Mateo Vázquez Torres, bajo mi dirección y tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

De acuerdo con lo indicado en el Reglamento de Estudios de Doctorado, declara también que la presente tesis doctoral es idónea para ser defendida en base a la modalidad de COMPENDIO DE PUBLICACIONES, en los que la participación del doctorando fue decisiva para su elaboración y las publicaciones se ajustan al Plan de Investigación.

En Lugo, 14 de agosto de 2023

Yo, Mateo Vázquez Torres, autor de esta tesis doctoral titulada *Estudio neuroanatómico comparado del órgano vomeronasal y del bulbo olfativo accesorio en la fauna salvaje. Análisis de su diversidad morfofuncional mediante la utilización de técnicas inmunohistoquímicas y de reconocimiento de glicoconjugados mediante lectinas*, declaro que:

- Esta tesis doctoral no presenta conflictos de interés.

- Todas las imágenes incluidas son originales y de elaboración propia. Aquellas que fuesen cedidas por otros autores serán específicamente indicadas en el pie de figura correspondiente.

En Lugo, a 14 de agosto de 2023

Fdo: Mateo Vázquez Torres

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En algún lugar, algo increíble está esperando a ser descubierto

Carl Sagan

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

AGRADECIMIENTOS

A Pablo, mi tutor y director de tesis, pero también mi amigo y mentor. Pablo es el principal responsable de que hoy este escribiendo este texto. Es una persona humilde, afable, trabajadora, divertida, empática e incombustible, que me ha aportado seguridad y tranquilidad a lo largo de estos años. He intentado aprender de su ejemplo tanto profesional como personal. Gracias por darme esta oportunidad y por confiar en mí.

A mis compañeras de doctorado, por acompañarme y ayudarme en este camino. Me habéis inspirado y regalado muy buenos momentos. Gracias a Irene, Paula, Sara, Dori y Sonia.

A todos los estudiantes que han pasado por el departamento de anatomía a lo largo de estos años, tanto para realizar estancias como TFGs. Ha sido un placer compartir con vosotros la ilusión por la investigación.

A los compañeros veterinarios de "Marcelle Natureza", que han colaborado con nosotros y contribuido a enriquecer esta tesis doctoral. Gracias a Andrea, Esther y José Luís por su buen trato y su profesionalidad.

A los compañeros docentes del departamento de Anatomía: Matilde, Patricia, Nuria, Manolo y Roberto. Gracias por vuestra ayuda, buen trato y acogida, habéis conseguido que me sienta valorado y a gusto desde el primer día.

A mi familia. En especial, a mi madre María José, por su apoyo incondicional. Asimismo, gracias a mis abuelos Orlando, Rufina, Maruja y Cesáreo, a mis hermanos Sandra y Dani, a mi cuñado Peni, a mi sobrino Adri, a mi padre Ramón, a mis tíos Manolo y Tina y demás familia.

A mis compañeros de piso en Lugo. Gracias por cuidarme y acompañarme durante tantos años. He aprendido mucho de vosotros y me habéis hecho ser muy feliz. Gracias por tantos buenos recuerdos a Maqui, Orión, Antón y Fabe.

A todos mis amigos de A Estrada. Con mención especial para Porto, Tato y Fabio. Gracias por vuestra compañía de calidad y vuestro cariño. Asimismo, gracias a Charliño, Mundi y Xurxo por tan buenas aventuras con nuestro grupo Templanza.

Finalmente, gracias a todas las personas que no he nombrado pero que igualmente han formado parte de mi vida. A todos, agradezco vuestra presencia y os llevo en el corazón.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ABREVIATURAS

AA: Azul Alcián

BO: Bulbo olfativo

BOA: Bulbo olfativo accesorio

BOP: Bulbo olfativo principal

BSA: Albúmina de suero bovino

BSI-B_4: *Bandeiraea simplicifolia* isolectina B_4

CB: Calbindina

CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad

CPg: Células periglomerulares

CR: Calretinina

CYK8: Citoqueratina 8

DAB: Diaminobencidina

DBA: *Dolichos Biflorus* aglutinina

ER: Epitelio respiratorio

ES: Epitelio sensitivo

EN: Enolasa

FPR: Receptores de péptidos de formilo

GAP-43: Proteína 43 asociada al crecimiento

GFAP: Proteína ácida fibrilar glial

GV: Glándulas vomeronasales

HE: Hematoxilina-eosina

HRP: Peroxidasa de rábano picante

LHRH: Hormona liberadora de hormona anti-luteinizante

LEA: *Lycopersicon esculentum* aglutinina

Lp: Lamina propria

MAP2: Proteína 2 asociada a microtúbulos

NC: Neurocalcina

NVN: Nervios vomeronasales

OMP: Proteína marcadora olfativa

OVN: Órgano vomeronasal

PAS: Ácido peryódico de Schiff

PGP 9.5: Producto del gen de la proteína 9.5

PV: Parvalbúmina

RV: Receptores vomeronasales

SBA: Aglutinina del haba de soja

SG: Secretagoguina

SMI-32: Anticuerpo monoclonal contra la proteína del neurofilamento

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

SNC: Sistema nervioso central

STA: *Solanum tuberosum* aglutinina

STL: Lectina de *Solanum tuberosum*

SVN: Sistema vomeronasal

TOL: Tracto olfativo lateral

UEA: *Ulex europaeus* aglutinina

V1R: Receptores vomeronasales tipo 1

V2R: Receptores vomeronasales tipo 2

VVA: *Vicia villosa* aglutinina

WGA: Lectina del germen de trigo

ZSV: Zona subventricular

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ÍNDICE

RESUMEN **11**
RESUMO **13**
ABSTRACT **15**
1 INTRODUCCIÓN **17**
1.1 COMUNICACIÓN QUÍMICA EN LOS MAMÍFEROS **17**
1.1.1 Tipos de señales químicas **18**
1.1.1.1 Feromonas 20
1.1.1.2 Cairomonas 21
1.1.2 Órganos exocrinos responsables **22**
1.1.3 Etología y marcaje químico **24**
1.1.4 Sistemas de detección de señales químicas **27**
1.1.4.1 Subsistemas olfativos 29
1.2 SISTEMA VOMERONASAL **33**
1.2.1 Neuroanatomía del órgano vomeronasal **37**
1.2.2 Neuroanatomía del bulbo olfativo accesorio **44**
1.3 ASPECTOS ESPECÍFICOS **54**
1.3.1 Capibara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) **55**
1.3.2 Ualabí de Bennett (*Notamacropus rufogriseus*) **57**
1.3.3 Suricata (*Suricata suricatta*) **58**
1.3.4 Gacela dama (*Nanger dama*) **60**
2 OBJETIVOS **62**
3 MATERIAL Y MÉTODOS **65**
3.1 EXTRACCIÓN Y DISECCIÓN DE LAS MUESTRAS **65**
3.1.1 Cavidad nasal **66**
3.1.2 Órganos y nervios vomeronasales **66**
3.1.3 Bulbos olfativos principales y accesorios **66**
3.2 PROCESAMIENTO Y CORTE DE LAS MUESTRAS **67**
3.3 TINCIONES HISTOLÓGICAS **67**
3.3.1 Tinciones generales **67**
3.3.1.1 Hematoxilina-eosina (HE) 67
3.3.1.2 Ácido peryódico de Schiff (PAS) 68
3.3.1.3 Azul alcián (AA) 68

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.3.2 Tinciones específicas 68
3.3.2.1 Tricrómico de Gallego 68
3.3.2.2 Tinción de Nissl 69
3.3.2.3 Tinción de Tolivia 69
3.4 TINCIONES HISTOQUÍMICAS E INMUNOHISTOQUÍMICAS 69
3.4.1 Tinciones histoquímicas 69
3.4.2 Tinciones inmunohistoquímicas 71
3.5 MICROSCOPÍA DE BARRIDO CON LÁSER CONFOCAL 72
3.6 ADQUISICIÓN DE IMÁGENES Y TRATAMIENTO DIGITAL 72
4 PUBLICACIONES 74
4.1 PUBLICACIÓN NÚMERO 1 75
4.2 PUBLICACIÓN NÚMERO 2 94
4.3 PUBLICACIÓN NÚMERO 3 114
4.4 PUBLICACIÓN NÚMERO 4 144
5 DISCUSIÓN 173
5.1 CAPIBARA 176
5.2 UALABÍ 181
5.3 SURICATA 186
5.4 GACELA DAMA 192
6 CONCLUSIONES 203
7 BIBLIOGRAFÍA 205
8 ANEXO I 252

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

RESUMEN

En los mamíferos salvajes, sentidos químicos como el olfativo o el sentido vomeronasal son cruciales para la supervivencia. El sistema vomeronasal (SVN) es el sistema sensorial responsable en la mayoría de los vertebrados de la detección de feromonas. Estas señales quimiosensoriales se emplean para establecer una comunicación efectiva entre individuos de la misma especie y se caracterizan por estar vinculadas a conductas parentales, territoriales y sociosexuales innatas. Asimismo, las feromonas pueden transmitir información sobre el estado emocional de un individuo, influyendo en las respuestas de estrés y miedo del receptor.

Debido a estas características, las feromonas poseen prometedoras implicaciones en el campo de la reproducción y del bienestar animal, siendo ya empleadas de forma incipiente para mejorar los parámetros reproductivos y disminuir los niveles de estrés. Sin embargo, el SVN presenta una acusada diversidad morfofuncional y genómica entre las diferentes especies, lo que dificulta y reduce significativamente el potencial uso de las feromonas. Es decir, para desarrollar técnicas que empleen feromonas de una forma fundada y consistente, es necesario contar con un conocimiento sólido de las bases neuroanatómicas del SVN de la especie en cuestión. En cambio, en la actualidad, son escasas las especies de mamíferos en las que disponemos de información morfofuncional sobre su SVN, siendo los roedores de laboratorio las únicas especies estudiadas en profundidad.

Por este motivo, el objetivo general de nuestras investigaciones ha sido profundizar y ampliar el conocimiento sobre las bases morfofuncionales de la comunicación química mediada por feromonas en especies de mamíferos salvajes de las cuales no se dispone o apenas disponemos de información al respecto. Nuestra estrategia consistió en seleccionar especies de diferentes órdenes taxonómicos con el objetivo de disponer, al menos, de un SVN representativo por cada grupo de mamíferos estudiado. Se ha elegido un roedor salvaje, un marsupial diprotodonto, un artiodáctilo en peligro de extinción y un carnívoro. Asimismo, cada caso nos permitió abordar una serie de aspectos concretos que contribuyeron a desarrollar una comprensión más completa o actualizada del SVN de los mamíferos.

De este modo, hemos descrito de la forma más exhaustiva posible las características morfológicas, macroscópicas, microscópicas y neuroquímicas de los dos componentes fundamentales del sistema vomeronasal: el órgano vomeronasal (OVN), responsable de la captación de semioquímicos, y el bulbo olfativo accesorio (BOA), principal centro integrador

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de la información vomeronasal, donde se procesan los datos obtenidos y se trasmiten a otras áreas del cerebro.

Para ello, realizamos técnicas de anatomía macroscópica y microscópica, macro y micro disecciones, y empleamos diversas tinciones histológicas, tanto de rutina (Hematoxilina-eosina, Nissl) como específicas de cada uno de los elementos estructurales que conforman el OVN (PAS, Azul Alcián, tricrómico de Gallego) y el BOA (Tolivia). Adicionalmente, realizamos una caracterización neuroquímica de ambas estructuras mediante un número considerable de marcadores histoquímicos (lectinas) e inmunohistoquímicos.

Así, en esta tesis doctoral hemos extendido el estudio del SVN a cuatro especies de mamíferos salvajes relativamente alejadas filogenéticamente y con características propias, lo que ha contribuido a obtener una comprensión más completa y menos sesgada del SVN de los mamíferos. Asimismo, se han abordado cuestiones transversales como la madurez temprana del SVN en neonatos o la discusión sobre la supuesta existencia de un tercer tipo de modelo de SVN, recientemente establecido en base a la expresión de los dos principales tipos de receptores vomeronasales, V1R y V2R. Por otro lado, la información morfológica obtenida constituye un excelente punto de partida para la aplicación práctica de técnicas basadas en el uso de feromonas. En este caso, con una aplicación clara hacia el bienestar de los animales salvajes mantenidos en cautividad, ya sea en parques naturales, centros de recuperación u hogares.

Palabras clave: comunicación química, mamíferos salvajes, feromonas, órgano vomeronasal, bulbo olfativo accesorio

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

RESUMO

Nos mamíferos salvaxes, sentidos químicos como o olfactivo ou o sentido vomeronasal son cruciais para a supervivencia. O sistema vomeronasal (SVN) é o sistema sensorial responsable na maioría dos vertebrados da detección de feromonas. Estes sinais quimiosensoriales empréganse para establecer unha comunicación efectiva entre individuos da mesma especie e caracterízanse por estar vinculadas a condutas parentais, territoriais e sociosexuales innatas. Así mesmo, as feromonas poden transmitir información sobre o estado emocional dun individuo,influíndo nas respostas de estrés e medo do receptor.

Debido a estas características, as feromonas posúen prometedoras implicacións no campo da reprodución e do benestar animal, sendo xa empregadas de forma incipiente para mellorar os parámetros reprodutivos e diminuír os niveis de estrés. Con todo, o SVN presenta unha acusada diversidade morfofuncional e xenómica entre as diferentes especies, o que dificulta e reduce significativamente o potencial uso das feromonas. É dicir, para desenvolver técnicas que empreguen feromonas dunha forma fundada e consistente, é necesario contar cun coñecemento sólido das bases neuroanatómicas do SVN da especie en cuestión. En cambio, na actualidade, son escasas as especies de mamíferos nas que dispoñemos de información morfofuncional sobre a súa SVN, sendo os roedores de laboratorio as únicas especies estudadas en profundidade.

Por este motivo, o obxectivo xeral das nosas investigacións foi profundar e ampliar o coñecemento sobre as bases morfofuncionales da comunicación química mediada por feromonas en especies de mamíferos salvaxes das cales non se dispón ou apenas dispoñemos de información respecto diso. A nosa estratexia consistiu en seleccionar especies de diferentes ordes taxonómicos co obxectivo de dispoñer, polo menos, dun SVN representativo por cada grupo de mamíferos estudado. Elixiuse un roedor salvaxe, un marsupial diprotodonto, un artiodáctilo en perigo de extinción e un carnívoro. Así mesmo, cada caso permitiunos abordar unha serie de aspectos concretos que contribuíron a desenvolver unha comprensión máis completa ou actualizada do SVN dos mamíferos.

Deste xeito, describimos da forma máis exhaustiva posible as características morfolóxicas, macroscópicas, microscópicas e neuroquímicas dos dous compoñentes fundamentais do sistema vomeronasal: o órgano vomeronasal (OVN), responsable da captación de semioquímicos, e o bulbo olfactivo accesorio (BOA), principal centro integrador da información vomeronasal, onde se procesan os datos obtidos e transmítense a outras áreas do cerebro.

Para iso, realizamos técnicas de anatomía macroscópica e microscópica, macro e micro disecciónes, e empregamos diversas tinguiduras histolóxicas, tanto de rutina (Hematoxilina-

eosina, Nissl) como específicas de cada un dos elementos estruturais que conforman o OVN (PAS, Azul Alcián, tricrómico de Gallego) e o BOA (Tolivia). Adicionalmente, realizamos unha caracterización neuroquímica de ambas as estruturas mediante un número considerable de marcadores histoquímicos (lectinas) e inmunohistoquímicos.

Así, nesta tese doutoral habemos estendido o estudo do SVN a catro especies de mamíferos salvaxes relativamente afastadas filoxenéticamente e con características propias, o que contribuíu a obter unha comprensión máis completa e menos nesgada do SVN dos mamíferos. Así mesmo, abordáronse cuestións transversais como a madurez temperá do SVN en neonatos ou a discusión sobre a suposta existencia dun terceiro tipo de modelo de SVN, recentemente establecido en base á expresión dos dous principais tipos de receptores vomeronasales, V1R e V2R. Doutra banda, a información morfolóxica obtida constitúe un excelente punto de partida para a aplicación práctica de técnicas baseadas no uso de feromonas. Neste caso, cunha aplicación clara cara ao benestar dos animais salvaxes mantidos en catividade, xa sexa en parques naturais, centros de recuperación ou fogares.

Palabras chave: comunicación química, mamíferos salvaxes, feromonas, órgano vomeronasal, bulbo olfactivo accesorio

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ABSTRACT

In wild mammals, chemical senses such as the olfactory or vomeronasal sense are crucial for survival. The vomeronasal system (VNS) is the sensory system responsible for pheromone detection in most vertebrates. These chemosensory signals are used to establish effective communication between individuals of the same species and are characteristically linked to innate parental, territorial and sociosexual behaviors. Pheromones can also transmit information about an individual's emotional state, influencing the stress and fear responses of the recipient.

Because of these characteristics, pheromones have promising implications in the field of reproduction and animal welfare and are already being used in an incipient way to improve reproductive parameters and decrease stress levels. However, the VNS shows a marked morphofunctional and genomic diversity between species, which significantly hinders and reduces the potential use of pheromones. In other words, in order to develop techniques that use pheromones in a well-founded and consistent manner, a solid understanding of the neuroanatomical basis of the VNS of the species in question is required. In contrast, at present, few mammalian species have morphofunctional information on their VNS, with laboratory rodents being the only species deeply studied.

For this reason, the general aim of our research was to deepen and broaden our knowledge of the morphofunctional basis of pheromone-mediated chemical communication in wild mammalian species for which little or no information is available. Our strategy was to select species from different taxonomic orders with the aim of having at least one representative VNS for each mammalian group studied. A wild rodent, a marsupial diprotodont, an endangered artiodactyl and a carnivore were chosen. In addition, each case allowed us to address a few specific aspects that contributed to developing a more complete or updated understanding of the mammalian VNS.

In this way, we have described as exhaustively as possible the morphological, macroscopic, microscopic and neurochemical characteristics of the two fundamental components of the vomeronasal system: the vomeronasal organ (VNO), responsible for the uptake of semiochemicals, and the accessory olfactory bulb (AOB), the main centre integrating vomeronasal information, where the data obtained are processed and transmitted to other areas of the brain.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

To this end, we performed macroscopic and microscopic anatomical techniques, macro and micro dissections, and used various histological stains, both routine (haematoxylin-eosin, Nissl) and specific to each of the structural elements that make up the VNO (PAS, Alcian Blue, Gallego trichrome) and AOB (Tolivia). In addition, we performed a neurochemical characterization of both structures by means of a considerable number of histochemical (lectins) and immunohistochemical markers.

Thus, in this PhD thesis we have extended the study of the VNS to four relatively phylogenetically distant wild mammalian species with their own characteristics, which has contributed to a more complete and less biased understanding of the mammalian VNS. Cross-cutting issues such as the early maturation of the VNS in neonates or the discussion on the putative existence of a third type of VNS model, recently established on the basis of the expression of the two main types of vomeronasal receptors, V1R and V2R, have also been addressed. On the other hand, the morphological information obtained constitutes an excellent starting point for the practical application of techniques based on the use of pheromones. In this case, with a clear application towards the welfare of wild animals kept in captivity, whether in natural parks, recovery centres or homes.

Keywords: chemical communication, wild mammals, pheromones, vomeronasal organ, accessory olfactory bulb

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1 INTRODUCCIÓN

1.1 COMUNICACIÓN QUÍMICA EN LOS MAMÍFEROS

A lo largo de la evolución, los seres vivos han desarrollado complejos sistemas de comunicación química con el objetivo de poder interactuar con el medio externo y mejorar su índice de supervivencia (Stevens, 2013). De este modo, son capaces de reconocer una gran variedad de señales químicas y traducirlas en información sensorial (Wyatt, 2003). Cuando estas señales químicas se intercambian entre diferentes individuos, las sustancias que transmiten estos mensajes se denominan semioquímicos (Wood, 1983). Estos semioquímicos se emiten mediante la orina, heces, saliva y secreciones de diversas glándulas cutáneas para ser depositadas en el ambiente por medio de conductas muchas veces estereotipadas (Castañeda *et al*., 2007). Esta comunicación química desempeña un papel clave ya que influye en aspectos tan relevantes como la conducta social, la reproducción, la búsqueda de alimento o la huida frente a posibles predadores (Kokocińska-Kusiak *et al*., 2021). Esto sucede en parte porque los sistemas de detección química se proyectan al sistema límbico, donde se regulan procesos como las emociones, la memoria, el hambre, los instintos sexuales y en definitiva la conducta (Iovino *et al*., 2019). Asimismo, estos semioquímicos actúan en colaboración con otras señales percibidas por sentidos físicos (auditivas, visuales o táctiles), para transmitir información sobre la especie, el sexo, el estatus social y el estado fisiológico y de desarrollo (Berüter *et al*., 1973).

El sentido químico, que surgió en las etapas más tempranas de la evolución, se encuentra presente en todos los organismos vivos, desde las bacterias hasta las formas de vida más complejas. Por tanto, todos los animales están preadaptados a la percepción de diversas señales químicas (Wilson, 1970). Sin embargo, los organismos primitivos perciben los estímulos mediante células especializadas mientras que los vertebrados han desarrollado órganos altamente sofisticados. De forma que, si la percepción de un determinado estímulo químico aumenta la supervivencia o el éxito reproductivo, la adaptación tiene como objetivo reducir el umbral de sensibilidad a esta sustancia y/o aumentar la expresión de los genes responsables de su percepción (Surov & Maltsev, 2016). Pero la identificación de una plétora tan diversa de moléculas (lípidos esenciales, lipoproteínas, proteínas, esteroides, alcoholes, etc.), con un rango tan diverso de volatilidades y solubilidades, requiere una gran diversidad de quimiorreceptores. Entre ellos sobresalen los receptores olfativos, presentes filogenéticamente en la roseta olfativa de los peces (Villamayor *et al*., 2021) y muy conservados y expandidos en los mamíferos (Saraiva *et al*., 2015). De hecho, la superfamilia de genes de mamíferos más grande corresponde a la conformada por los receptores olfativos. Estos captan una compleja red de mezclas de olores que permiten crear una imagen tridimensional y dinámica del mundo circundante a lo largo del tiempo (Meister, 2015). Dependiendo de características fisicoquímicas de las señales detectadas, como son la volatilidad o su dispersión en el espacio, la información captada se multiplicará (Mollo *et al*., 2017).

USC DE COMPOSTELA

Específicamente, el sistema olfativo, reconocido como uno de los sistemas de comunicación química más prominentes junto con el sentido del gusto, es uno de los primeros sentidos en activarse, permitiendo incluso el aprendizaje olfativo prenatal (Hepper & Wells, 2006). Sin embargo, en los mamíferos, las señales químicas olorosas tienen la capacidad de estimular diversas estructuras quimiosensoriales, que van más allá del órgano olfativo: como por ejemplo el órgano vomeronasal, el órgano septal de Masera, el ganglio de Grüneberg y las terminaciones nerviosas libres del nervio trigémino entre otras.

1.1.1 Tipos de señales químicas

En la naturaleza, los organismos vivos mantienen un grado constante de comunicación basado en el intercambio de múltiples señales químicas (Weissburg *et al*., 2002) debido a una variedad de razones, fundamentalmente asociadas con su necesidad de alimento, protección y reproducción. Estas señales químicas se pueden clasificar en dos tipos: hormonas, cuando actúan en el seno del mismo individuo que las produce; o semioquímicos, cuando actúan en un individuo diferente al productor de la señal. Las hormonas son moléculas de señalización química producidas por tejidos o glándulas endocrinas que controlan varios procesos fisiológicos dentro de un organismo (Nordlund & Lewis, 1976). Paralelamente, las sustancias químicas que utilizan los diferentes organismos para comunicarse entre sí y percibir su entorno se denominan semioquímicos, nombre derivado de la raíz griega *semeon*, que significa marca o señal (Law & Regnier, 1971). Esta comunicación química está presente tanto en microorganismos, plantas e insectos (Calcagnile *et al*., 2019) como en vertebrados (Burger, 2005) y requiere de mecanismos secretores específicos de semioquímicos, los cuales inducen cambios en la fisiología, metabolismo o comportamiento de las especies receptoras de las señales quimiosensoriales (Apfelbach *et al*., 2005).

Los semioquímicos se clasifican en feromonas, si actúan sobre individuos de la misma especie, o alelomonas, si actúan sobre individuos de una especie diferente (Dicke & Sabelis, 1988). En ambos casos, estas señales químicas pueden estar compuestas por un solo producto químico o por una mezcla de varios. En cuanto a las feromonas, éstas establecen una comunicación química entre miembros de la misma especie regulando aspectos como el desarrollo, el estado fisiológico, la conducta social, la reproducción o el marcaje territorial (Wyatt, 2010). En cambio, las alelomonas o aleloquímicos se clasifican a su vez, según el beneficiario de la interacción en cuatro tipos: alomonas, donde el emisor se beneficia del mensaje; cairomonas, donde el receptor es el beneficiado; sinomonas, cuando ambas especies se benefician de la comunicación y apneumonas, cuando la señal química es emitida por un material inanimado y evoca en el receptor una reacción conductual o fisiológica adaptativamente favorable.

Las alomonas, término resultante de la unión de las raíces griegas *allos* y *hormonas* que significa excitar a otros, se definen como señales químicas interespecíficas que dan una ventaja adaptativa a las especies que las producen (Sbarbati & Osculati, 2006). Se han descrito alomonas de muchos organismos, desde plantas inferiores a animales superiores, donde las

USC UNIVERSIDADE

emitidas por depredadores son principalmente atrayentes de presas (Blum, 1996; Gallie & Chang, 1997), y las producidas por presas son principalmente repelentes de depredadores (Apfelbach *et al*., 2005). Por ejemplo, los venenos o los antibióticos son alomonas, ya que son compuestos químicos producidos por microorganismos con el objetivo de inhibir el crecimiento de otras especies de microorganismos. Por otro lado, una cairomona es un aleloquímico que cuando entra en contacto con un individuo de otra especie, evoca en el receptor una respuesta conductual o fisiológica adaptativamente favorable, mientras resulta desfavorable para el emisor (Wood, 1983). Una característica relevante de las categorías principales de mensajeros químicos es que no son mutuamente excluyentes, y un ejemplo de esto sucede con el depredador *Elatophilus hebraicus*, que utiliza la feromona sexual de su presa *Matsucoccus josephi* como cairomona, de forma que cuando el depredador la percibe siente una gran atracción (Dunkelblum *et al*., 1996). Otro ejemplo es la secreción de las glándulas mandibulares de muchas hormigas cuando se perturba el nido, que actúa como una comunicación de alarma social (feromona), pero también tiene efecto repelente (alomona) contra los agresores (Cavill & Robertson, 1965).

Respecto a las sinomonas, se pueden definir como aleloquímicos producidos por un organismo, que cuando entran en contacto con un individuo de otra especie evocan en el receptor una respuesta conductual o fisiológica que resulta adaptativamente favorable para ambos (Dicke & Sabelis, 1988). Algunas sinomonas son repelentes y otras atrayentes (Mattiacci *et al*., 1994), tales como las moléculas repelentes que advierten de un peligro como la toxicidad de una planta (Stowe *et al*., 1995), o las señales químicas que se producen después de un ataque de parásitos con el objetivo de atraer al depredador natural del parásito (Han & Chen, 2002).

Por último, existe un grupo de aleloquímicos originados a partir de fuentes inanimadas, las apneumonas, término formado con la raíz griega *a-pne* que significa sin aliento o sin vida. El receptor se beneficia de estas moléculas, pero difieren de las cairomonas en que el productor no puede experimentar ninguna desventaja (Pernaa & Aksela, 2011). Sin embargo, estas apneumonas están relacionadas con la presencia de ciertas presas en determinados ambientes, por lo que resulta perjudicial para los organismos de otra especie relacionados con dichos compuestos y que puedan encontrarse cerca o sobre el material inanimado. Por ejemplo, los parásitos y depredadores son atraídos por apneumonas hacia sustancias inanimadas relacionadas con la presencia de sus huéspedes o presas (Kasinger *et al*., 2008).

Finalmente, es importante resaltar que el intercambio de estímulos quimiosensoriales se produce tanto en ambientes terrestres como acuáticos. Las características fisicoquímicas más significativas de estos compuestos químicos son su tamaño y su polaridad, ya que estos son los principales factores que determinan su volatilidad en el aire y solubilidad en agua, respectivamente. Así, en el medio terrestre, las sustancias que por su naturaleza actúan a distancia suelen ser pequeñas y volátiles, mientras que, en el medio acuático donde la solubilidad es el factor más relevante, incluso las moléculas de alto peso molecular pueden actuar a distancia. Por lo tanto, atendiendo a sus propiedades fisicoquímicas, de las que depende su movilidad potencial en los diferentes medios, las señales químicas se pueden clasificar en

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

cuatro tipos de compuestos: volátiles-solubles, volátiles-insolubles, no volátiles-solubles y no volátiles-insolubles (Mollo *et al*., 2017).

1.1.1.1 Feromonas

Dentro de los semioquímicos, las feromonas son compuestos que permiten la señalización química entre individuos de la misma especie. En 1959, el entomólogo Martin Luscher y el bioquímico Peter Karlson propusieron el término "feromona" al combinar las raíces griegas *pherein* (llevar) y *hormon* (excitar), y lo definieron como una sustancia química o una mezcla de sustancias químicas que liberadas por un miembro de una especie provocan respuestas comportamentales específicas o cambios fisiológicos en otros individuos de la misma especie cuando las perciben (Karlson & Luscher, 1959). De hecho, el primer semioquímico que se aisló y caracterizó fue la feromona sexual de la polilla del gusano de seda (Butenandt *et al*., 1959). Posteriormente, se definieron dos categorías de feromonas atendiendo al efecto sobre el organismo beneficiario: feromonas liberadoras y feromonas promotoras. Las liberadoras causan efectos conductuales instantáneos en los organismos receptores, en cambio, las promotoras provocan efectos fisiológicos a largo plazo en el individuo receptor (Wilson, 1965). De este modo, las feromonas liberadoras típicas influyen en aspectos sexuales, de alerta, de rastro y de marcaje territorial. Por otra parte, los compuestos que determinan la casta de los insectos sociales son feromonas promotoras (Conte & Hefetz, 2008). A raíz de estos descubrimientos, las feromonas han sido profusamente estudiadas en insectos, principalmente por su potencial para controlar plagas (Cork *et al*., 2003), pero también han sido objeto de numerosos estudios en mamíferos (Liberles, 2014).

Desde hace décadas se asume la existencia de feromonas en mamíferos (Brennan & Zufall, 2006), aunque ciertos autores mostraron sus dudas al respecto (Beauchamp *et al*., 1976). Ciertamente, el concepto de feromona deriva de estudios realizados en insectos, y la integración del término en vertebrados ha generado controversia debido a la complejidad de información recibida simultáneamente por medio de otras modalidades sensoriales y la importancia del aprendizaje en mamíferos, el cual puede modificar el comportamiento dificultando el análisis específico de la comunicación quimiosensorial (Brown, 1979). En particular, en los cerdos (*Sus scrofa*) son necesarias las feromonas presentes en la saliva del macho para el cortejo y la cópula, pero también son necesarios los estímulos físicos que se producen mediante la aplicación de presión sobre la espalda de la hembra (Booth & Signoret, 1992). Por ello, se han introducido cinco requisitos operativos que una sustancia ha de tener para ser considerada feromona: simplicidad química de la señal; alta selectividad del estímulo con su respuesta; respuesta conductual del receptor inequívoca, morfológicamente invariable y funcionalmente obvia; especificidad de la recepción en función de la especie y un acoplamiento incondicional entre el estímulo y la respuesta (Schaal *et al*., 2003). En su revisión bibliográfica sobre las señales químicas en vertebrados terrestres, Apps *et al*., (2015) identificaron hasta 63 feromonas en

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

mamíferos, tales como ratones (Novotny *et al*., 1985; Lin *et al*., 2005; Ferrero *et al*., 2013), hámsters (Singer *et al*., 1976), cerdos (Dorries *et al*., 1995) o elefantes (Rasmussen *et al*., 2003).

1.1.1.2 Cairomonas

Las cairomonas, término formado con la raíz griega *kairo* (oportunista), son aleloquímicos interespecíficos que dan una ventaja adaptativa al organismo que recibe la señal química mientras resultan desfavorables para el emisor. Por lo tanto, las cairomonas son semioquímicos emitidos por una especie en su desventaja (Brown *et al*., 1970). De todos modos, aunque las cairomonas son compuestos peligrosos para los organismos que los emiten, se ha sugerido que podrían conducir a una ventaja evolutiva (Lass & Bittner, 2002). Y aunque el término cairomona fue objeto de polémica tras ser introducido, actualmente es ampliamente aceptado (Weldon, 1980; Pasteels, 1982). Debido a la diversidad de fenómenos ecológicos relacionados con las cairomonas, éstas se pueden clasificar conforme a varios criterios. Según el efecto sobre el organismo beneficiado se distinguen dos clases: cairomonas liberadoras, que inducen una respuesta conductual inmediata y cairomonas promotoras, que inducen a respuestas fisiológicas a largo plazo en el receptor. Pero también se pueden clasificar atendiendo a la función en el individuo receptor, dando como resultado cuatro grupos principales: cairomonas de forrajeo, cairomonas anti-depredador, cairomonas sexuales y cairomonas de agregación (Ruther *et al*., 2002). De este modo, las cairomonas de forrajeo son utilizadas para la localización de alimentos (Ayelo *et al*., 2021), las cairomonas anti-depredador para reducir el impacto negativo de un enemigo natural (Schonewolf *et al*., 2006) y las cairomonas sexuales para encontrar pareja u otras finalidades sexuales (Reinecke *et al*., 2002). Por último, las cairomonas de agregación son utilizadas por ambos sexos de la especie receptora para formar agregaciones con diferentes objetivos, como la explotación óptima de los recursos alimentarios, la búsqueda de pareja o la reacción de defensa. Algunos ejemplos de cairomonas forrajeras son las sustancias que produce el gusano del maíz (*Heliothis zea*), utilizadas por el parásito *Microplitis croceipes* para encontrar a su huésped (Jones *et al*., 1971) o el ácido láctico que emiten los seres humanos, que atrae al mosquito responsable de la transmisión de la fiebre amarilla *Aedes aegypti* (Acree *et al*., 1968). En algunos casos, las cairomonas utilizadas para encontrar un huésped, son producidas por otros microorganismos que se desarrollan en el huésped (Thibout *et al*., 1995). En los casos anteriores, las señales químicas ayudan a los depredadores o parásitos a encontrar a sus presas o huéspedes, pero también puede suceder lo contrario, ya que las cairomonas anti-depredador emitidas por depredadores o parásitos son utilizadas como señal de alarma e inducen un comportamiento defensivo en los organismos receptores (Schoeppner & Relyea, 2005). Este es el caso de ciertas plantas que reconocen cairomonas producidas por herbívoros y emiten compuestos para repelerlos o para intentar atraer a sus enemigos naturales (Arimura *et al*., 2004). Finalmente, las cairomonas sexuales influyen indirectamente en la comunicación sexual, y pueden ser utilizadas para encontrar pareja, como los alcoholes emitidos por las hojas verdes cuando las hembras del escarabajo

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Melolontha spp se alimentan con ellas, que atraen a los machos de la misma especie (Reinecke *et al*., 2006).

1.1.2 Órganos exocrinos responsables

La evolución independiente de los múltiples semioquímicos ha dado como resultado en los mamíferos la aparición de una gran diversidad, tanto de compuestos producidos como de glándulas secretoras especializadas. Estas señales son emitidas habitualmente al exterior mediante las heces, la orina o la saliva, pero también están presentes en otras secreciones como las lagrimales, vaginales (Kelly, 2000) o se producen en glándulas específicas como las perianales (Berüter *et al*., 1974). Las sustancias excretadas a través de la orina o las heces pueden proporcionar información acerca de la edad, la identidad o el sexo del depositante. De hecho, existen posturas corporales o patrones de movimiento asociados a la micción y defecación, como los movimientos de dispersión, que facilitan esta comunicación química (Altmann *et al*., 1987). También aportan información sobre la localización de los individuos, algo especialmente relevante en una amplia variedad de contextos como son la estructuración social o el reparto del territorio.

De este modo, las heces tienen una gran importancia en el marcado y en la comunicación química intraespecífica de muchos mamíferos. Algunos compuestos odoríferos se originan en las secreciones del saco anal, pero otros son el resultado de la acción bacteriana sobre los alimentos en la digestión (Martín *et al*., 2010). En cerdos, se han detectado varios semioquímicos presentes en las heces maternas que atraen a los lechones, y provocan en ellos cambios comportamentales positivos, actuando como calmante y mejorando las tasas de crecimiento (Aviles-Rosa *et al*., 2020).

Pero también se pueden identificar sustancias volátiles y no volátiles que actúan como señales químicas en la orina de la mayoría de los mamíferos, dado que es un medio básico utilizado en la comunicación entre animales (Ewer, 1968). En los conejillos de Indias, las sustancias químicas urinarias están involucradas en la discriminación entre sexos (Berüter *et al.*, 1973). Adicionalmente, en la orina de los gatos domésticos y otros miembros de la familia Felidae se encuentra el aminoácido felinina, responsable del olor característico de la orina en esta especie e implicado en el marcaje territorial (Bradshaw & Cameron-Beaumont, 2000). Se encuentra en grandes cantidades en la orina de los machos a partir de los seis meses de edad y se piensa que es el precursor de una feromona que atrae a las hembras (Miyazaki *et al*., 2006).

En la saliva también se encuentran múltiples semioquímicos, como en el caso del verraco, que presenta esteroides androgénicos en su saliva que actúan como atrayentes sexuales, e incluso pueden estimular la pubertad en hembras juveniles (Stefańczyk-Krzymowska *et al*., 2003). Estos compuestos son producidos en los testículos y transportados por el torrente sanguíneo a las glándulas salivales submaxilares (Booth, 1984) donde se emiten en grandes cantidades en el momento de la cópula.

USC DE COMPOSTELA

De igual modo, en mamíferos, los estímulos químicos relacionados con los comportamientos sexuales se producen en los genitales o cerca de ellos. Por ejemplo, el macho porcino produce un atrayente sexual que forma parte de sus secreciones prepuciales (Pietras, 1981), mientras que los hámsteres machos sexualmente experimentados son atraídos por las secreciones vaginales de las hembras (Singer *et al*., 1976). Antes de la cópula, los machos olfatean y lamen estas secreciones, ya que contienen productos químicos indispensables para un adecuado comportamiento sexual (Murphy & Schneider, 1970). Algo similar ocurre en primates, donde un compuesto químico presente en las secreciones vaginales de las hembras provoca un comportamiento copulatorio en los machos conespecíficos. Este semioquímico, la copulina, es estimulado por estrógenos y aumenta la capacidad de respuesta sexual en monos rhesus (Michael & Keverne, 1970). En otras especies como en cánidos (Goodwin *et al*., 1979)o bóvidos (Rivard & Klemm, 1989), también se ha observado la presencia de moléculas sexualmente atrayentes en las secreciones vaginales de las hembras.

Por otra parte, diversas glándulas cutáneas están implicadas en la producción y emisión de señales químicas. Estas glándulas cutáneas exocrinas vierten sus compuestos mediante un sistema de conductos, y dependiendo del tipo de secreción se dividen en sudoríparas y sebáceas. Las sudoríparas, están relacionadas con la producción de sudor y contienen moléculas hidrófilas, mientras que las sebáceas liberan sebo y sustancias lipófilas. Por consiguiente, las diversas glándulas cutáneas pueden producir una mezcla compleja de señales químicas. Asimismo, en función del mecanismo de liberación de la secreción, las glándulas exocrinas también se clasifican en apocrinas, holocrinas y merocrinas o ecrinas. En las glándulas apocrinas una porción del citoplasma de las células forma parte de la secreción, en las glándulas holocrinas las células se destruyen casi al completo y pasan a formar parte del producto de secreción y finalmente, en las glándulas merocrinas la secreción se produce por un mecanismo de exocitosis, por lo que no se produce lesión en las células secretoras. Así, ejemplos de apocrinas son las glándulas mamarias, de holocrinas las glándulas sebáceas y de merocrinas las glándulas salivares.

A continuación, se describen varios ejemplos de glándulas productoras de semioquímicos en mamíferos. En conejos, las glándulas apocrinas del mentón intervienen en el mantenimiento del estatus social y son utilizadas para marcar el territorio por los machos dominantes (Hayes *et al*., 2002a). Los jerbos machos emplean la secreción de una glándula sebácea dependiente de los niveles de andrógenos para marcar el territorio (Thiessen *et al*., 1968). Otras glándulas sebáceas apocrinas, las glándulas tarsales del ciervo macho (*Odocoileus hemionus columbianus*), secretan una serie de moléculas entre las que destaca un semioquímico que provoca el lamido de sus congéneres femeninos (Müller-Schwarze, 1971). En los machos de berrendo (*Antilocapra americana*), se identificó un compuesto producido en la glándula subauricular que induce al lamido, marcaje o golpeo en otros machos de la misma especie(Müller-Schwarze *et al*., 1974). Otra glándula sebácea específica es la gándula del morrillo, que se encuentra exclusivamente sobre el hocico en los machos de capibara y está relacionada con la producción de semioquímicos. Estos compuestos son producidos en mayor medida por machos dominantes y se utilizan para el marcaje territorial al ser depositadas en la vegetación

USACH
UNIVERSIDAD DE SANTIAGO

(Macdonald *et al*., 1984). En el caso de las cobayas (*Cavia porcellus*), la secreción sebácea de la glándula perineal interviene en la dominancia (Beauchamp, 1974). Del mismo modo, en petauros (*Petaurus breviceps*), los machos dominantes poseen una glándula frontal y otra esternal, con las que marcan el territorio y a otros miembros de su grupo familiar. Asimismo, tanto machos como hembras de petauro emiten señales químicas mediante las glándulas paracloacales (Schultze-Westrum, 1965). Las glándulas merocrinas o ecrinas son abundantes en humanos y primates, pero en el resto de los mamíferos su localización se restringe a las palmas de las manos y de los pies. Por ejemplo, el tenrec de Madagascar (*Echinops telfairi*) presenta glándulas ecrinas cutáneas en las almohadillas de las patas, las cuales producen una secreción antideslizante que contiene semioquímicos inhibidores del crecimiento de microorganismos (Stumpf *et al*., 2004). Por último, se han estudiado glándulas productoras de estímulos quimiosensoriales en visones que se vuelven vestigiales al destete. Se trata de glándulas sudoríparas apocrinas presentes en el cuello y en las regiones perineal e inguinal relacionadas con el reconocimiento materno de las crías (Yager *et al*., 1988).

1.1.3 Etología y marcaje químico

En los mamíferos, las señales químicas pueden ser emitidas de forma pasiva, sin estar asociados a una conducta concreta, o bien, pueden implicar un despliegue específico de patrones conductuales que facilitan la diseminación de dicha señal en el ambiente. Por ejemplo, el macho porcino emite pasivamente en sus secreciones prepuciales un atrayente sexual (Izard, 1983). Pero, asimismo, también presenta conductas específicas, como los movimientos de masticación que aumentan la producción de secreción salivar. Esta contiene semioquímicos como la androstenona o el androstenol, producidos en los testículos y almacenados en la glándula parótida, que estimulan el reflejo de inmovilidad de las hembras porcinas facilitando la adopción de la postura de apareamiento (Melrose *et al*., 1971). Estos marcajes específicos (*scent marking* en inglés) se han descrito en numerosos mamíferos, existiendo una gran variedad de patrones de conducta caracterizados en las distintas especies. Esta diversidad resulta de las diferentes funciones que puede implicar la comunicación química (Gosling, 1982), de los múltiples lugares de deposición de la señal (Eisenberg & Kleiman, 1972) o incluso de la ubicación de las glándulas exocrinas en el cuerpo.

Respecto a la función, en un primer momento se estableció una relación entre el marcaje y la defensa territorial, sin embargo, este comportamiento puede desempeñar otros muchos papeles en la comunicación. De hecho, varios autores propusieron diversas funciones del marcaje químico (Johnson, 1973). De este modo, el marcaje puede actuar como disuasivo, evitando la agresión al advertir sobre la ocupación del territorio; como atrayente o estimulante sexual; como herramienta de orientación; como indicador de la identidad, edad o dominancia; como señal de alarma para los congéneres o incluso como regulador e indicador del tamaño de la población.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En cuanto a la función territorial, las marcas químicas definen un área determinada e impiden que los intrusos entren o provocan su retirada, reduciendo los costes defensivos. Por tanto, los animales depositan estos compuestos en los límites de su terreno y en localizaciones estratégicas como método de dominancia territorial. Este comportamiento se refleja también en ratones estudiados experimentalmente, ya que los individuos subordinados pasan menos tiempo en partes de una jaula tratada con orina de macho dominante (Jones & Nowell, 1974). Por otro lado, en conejos se ha demostrado que al adquirir un macho el estatus de dominante sintetiza en su glándula mentoniana 2-fenoxietanol, el cual actúa como fijador haciendo que sus secreciones persistan en el medio sin disiparse (Hayes *et al*, 2003).

Igualmente, el marcado puede tener una función estimulante o de atracción en el sexo opuesto, como sucede en cánidos, donde las hembras muestran una mayor frecuencia de marcaje con orina durante el celo para atraer a los machos (Wirant *et al*., 2007). En el caso de la mangosta rayada (*Mungos mungo*), un herpéstido de comportamiento social y cooperativo, tanto machos como hembras aumentaron la frecuencia de marcado durante el estro de estas últimas (Müller & Manser, 2008). Por otro lado, en roedores, la secreción prepucial y la orina de los machos tienen la capacidad de inducir o suprimir el celo y la ovulación en hembras, además de acelerar la madurez sexual femenina (Bronson & Whitten, 1968; Bronson & Caroom, 1971).

Otra función de las marcas químicas es la orientación espacial de los individuos que las producen dentro de su territorio, lo que les permite una mejor familiarización con el ambiente. De este modo, especies como los loris perezoso (*Nycticebus coucang*) utilizan marcas químicas para trazar senderos (Seitz, 1969). Asimismo, otros mamíferos como los coyotes (*Canis latrans*) marcan con orina los alimentos o las zonas donde esconden la comida (Harrington, 1982).

Las conductas de marcaje son utilizadas igualmente para depositar señales químicas que sirven como indicador de la identidad individual y aportan información sobre la dominancia, el rango social, el sexo o la edad. De esta manera, los castores (*Castor canadensis*) son capaces de discriminar entre individuos familiares o extraños (Sun & Müller-Schwarze, 1997), al igual que los petauros (*Petaurus breviceps papuanus*), que no solo son capaces de distinguir tanto individuos como grupos de individuos desconocidos, sino que dichas señales desencadenan en el receptor comportamientos agresivos (Schultze-Westrum, 1965). Esta relación entre el reconocimiento individual y la dominancia se ve reflejada en los patrones de marcaje. Así, los individuos dominantes suelen marcar con mayor frecuencia que los subdominantes o sumisos, y son significativamente más propensos a adoptar posturas específicas de marcado, como sucede en cánidos (Jordan *et al*., 2013). Igualmente, los individuos dominantes marcan de forma asidua en situaciones en las que son intolerantes. Por otro lado, las señales químicas permiten el reconocimiento entre machos y hembras (Ferkin & Johnston, 1995) e incluso inducen la sincronización del estado reproductivo (Hradecký, 1985).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En ocasiones, los individuos estresados secretan moléculas químicas de alarma, que mantienen alerta a los miembros de su grupo. La exposición a estas señales produce cambios comportamentales en el receptor como la disminución del descanso, el aumento de la frecuencia cardíaca o la hipertermia inducida por estrés. Este fenómeno ha sido estudiado en ratas (Kiyokawa *et al*., 2004). En vacas, la presencia de señales de alarma en la orina de congéneres estresados desencadena un aumento de cortisol y conductas temerosas en los individuos receptores (Boissy *et al*., 1998).

Finalmente, en ciertos animales se ha observado que el marcaje químico actúa como mecanismo de autorregulación de la población, limitando el número de habitantes antes de que el alimento se convierta en un factor limitante. Esto sucede en los castores americanos (*Castor canadensis*), que mediante el marcaje se comunican entre individuos, delineando así el territorio ocupado y evitando una mayor colonización de un área determinada. Así, se impide que la densidad de población aumente por encima de un límite, mientras se mantiene el equilibrio entre la cantidad de recursos demandados por los residentes y la capacidad regeneración que su hábitat puede sostener (Aleksiuk, 1968).

Atendiendo a los lugares de deposición de sustancias químicas, se han considerado cinco contextos: liberación directa al aire circundante, deposición sobre un objeto específico del medio, deposición sobre el sustrato, marcaje sobre un compañero social y automarcado o autounción.

Habitualmente asociamos la emisión de señales químicas con los patrones de comportamiento específicos de marcaje, pero lo cierto es que los mamíferos también tienen la capacidad de liberar compuestos químicos sin que haya ningún signo visible de ello. Por ejemplo, se ha reportado que muchas especies de mamíferos emiten señales químicas cuando están asustados, como el venado de cola negra, que secreta compuestos químicos en sus glándulas del metatarso cuando se encuentra en situaciones de miedo o estrés (Müller-Schwarze, 1971).

Por otro lado, el marcaje puede estar asociado a ciertos objetos, de forma que los animales depositan heces y orina sobre ellos o emplean movimientos de frotación con sus zonas glandulares para impregnarlos de secreciones específicas. Estos movimientos de marcado dirigidos a objetos a menudo implican la adopción de posturas inusuales y permiten depositar señales químicas una cierta altura, mejorando la eficiencia comunicativa (Bartecki & Heyman, 1990). Estos objetos pueden formar parte de un complejo sistema de comunicación entre individuos de la misma especie, como sucede en el oso pardo europeo (*Ursus arctos arctos*), que exhibe un comportamiento de frotación contra los troncos de los árboles. Al levantarse sobre sus patas traseras, restriegan el pecho, la espalda y el cuello mientras muerden y arañan la corteza depositando señales químicas. Los machos tienen zonas de marcado preferidas, que pueden ser utilizadas por un solo individuo o ser comunales y utilizadas por varios machos. Estos lugares marcados por un macho adulto desconocido son evitados por los osos jóvenes. Por otra parte, las hembras marcan en zonas separadas de los machos, pero también pueden

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

marcar en los troncos comunales junto con otros machos (Tschanz *et al*., 1970). En el caso de las cabras, cuando un macho llega a la madurez sexual, comienza a frotar su cabeza y cuello sobre los objetos que están a su alrededor, como método para dispersar señales químicas con efecto atrayente en las hembras (Wakabayashi *et al*., 2000).

Además del depósito de señales químicas mediante la orina o las heces en el sustrato, los mamíferos muestran conductas específicas de marcaje en el terreno. En particular, roedores de la familia *Heteromyidae* que habitan en el desierto realizan baños de arena (Eisenberg, 1963). Esta conducta consiste en excavar en el sustrato y realizar una serie de movimientos de frotamiento específicos dependiendo de la especie. De este modo, el animal se asea mientras esparce secreciones químicas en zonas de marcaje del entorno, que a veces son compartidas. Otros mamíferos presentan conductas como rascar la tierra, que pueden implicar la deposición de señales químicas producidas en las glándulas del autopodio.

Algunos mamíferos utilizan el marcaje sobre la pareja o sobre individuos conespecíficos mediante comportamientos característicos. Estas conductas pueden implicar movimientos de fricción con zonas glandulares específicas sobre el individuo receptor (Schultze-Westrum, 1965). El anteriormente citado marcaje de los conejos europeos frotando con su barbilla objetos o congéneres para impregnarlos con la secreción de las glándulas mentonianas, les permite identificar a los miembros de su grupo social, de cara al establecimiento de su territorio, manteniendo de esta manera la jerarquía social (Hayes *et al*., 2002a; Hayes *et al*., 2002b).

Finalmente, algunas especies de mamíferos utilizan fuentes propias o ajenas de señales químicas para esparcir los compuestos por su cuerpo con diferentes finalidades. De este modo, el venado de cola negra extiende la extremidad posterior para esparcir las previamente descritas secreciones de las glándulas tarsales sobre su propia cabeza (Müller-Schwarze, 1971). Asimismo, los monos araña exhiben un comportamiento de autounción frotando su cuerpo con una mezcla de saliva y material vegetal (Laska *et al*., 2007). Sin embargo, en otros casos los individuos utilizan señales químicas ajenas, como las ratas, que se impregnan de señales químicas de su depredador principal, la comadreja, para enmascarar su propia identidad química y evitar posibles ataques (Xu *et al*., 1995).

1.1.4 Sistemas de detección de señales químicas

Los animales examinan constantemente su entorno en busca de sustancias químicas que le encaminen a fuentes de alimentos o a hábitats favorables, pero también investigan otras sustancias que controlan la interacción social y el comportamiento reproductivo (Breer *et al*., 2006). Estos compuestos químicos se pueden detectar mediante el contacto directo con secreciones salivares o nasales, o al monitorear la corriente de aire respiratorio a través de la cavidad nasal. En ambos casos, las señales químicas son percibidas por detectores altamente especializados, las neuronas quimiosensoriales, que están organizadas en subsistemas estructural y funcionalmente independientes en la cavidad nasal. De este modo, estos

USC DE COMPOSTELA

subsistemas olfativos se pueden dividir según la ubicación anatómica de sus neuronas sensoriales, el tipo de receptores olfativos que expresan, los mecanismos de señalización que emplean para transducir estímulos quimiosensoriales, los estímulos químicos a los que responden y los objetivos axonales de sus neuronas sensoriales en regiones del prosencéfalo olfativo (Munger *et al*., 2009).

En un principio, se identificaron dos sistemas de percepción química con neuronas sensoriales ubicadas en la cavidad nasal, el sistema olfativo o principal y el sistema vomeronasal o accesorio. Las neuronas olfativas constituyen el epitelio olfativo principal, que recubre la parte posterior de la cavidad nasal y envía sus proyecciones nerviosas al bulbo olfativo principal (Cajal, 1906). En cambio, el sistema vomeronasal presenta una estructura sensorial periférica y altamente especializada donde se ubican las neuronas sensoriales del epitelio vomeronasal, el órgano vomeronasal (OVN). La información neurosensorial viaja a través de los nervios vomeronasales hasta el bulbo olfativo accesorio, estructura independiente y adyacente al bulbo olfativo principal (McCotter, 1912).

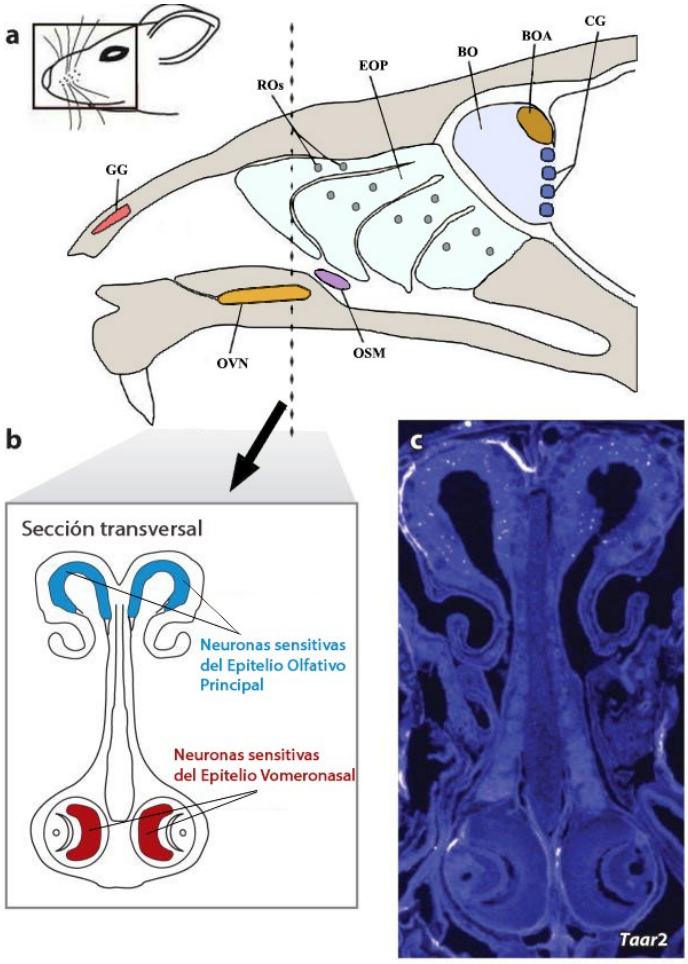

Ilustración 1. Topografía de los sistemas olfativos en la cavidad nasal del ratón. (A) Esquema de la sección sagital de la cavidad nasal en el ratón. (B) Ubicación de los diferentes epitelios sensitivos en una sección transversal de la cavidad nasal del ratón. (C) Las ribosondas de ARNc de Taar2 marcan las neuronas sensoriales en el epitelio olfativo principal pero no produce marcaje en el epitelio vomeronasal. Abreviaturas: (BO) Bulbo olfativo; (BOA) Bulbo Olfativo Accesorio; (CG) Collar Glomerular; (EOP) Epitelio Olfativo Principal; (GG) Ganglio de Grueneberg; (OSM) Órgano Septal de Masera; (OVN) Órgano Vomeronasal; (ROs) Receptores Olfativos. Ftes: Liberles (2014) Annu Rev Physiol. 76: 153.

Más recientemente, se han descubierto en la cavidad nasal de los mamíferos nuevos sistemas sensoriales especializados en la detección de semioquímicos y que en su conjunto se denominan subsistemas olfativos (Barrios *et al*., 2014). Este es el caso del ganglio de Grüneberg, el órgano septal o las células quimiosensoriales solitarias. El ganglio de Grüneberg es una estructura formada por neuronas sensoriales específicas que se localiza en la zona anterior de la cavidad nasal, en la proximidad del vestíbulo nasal (Fleischer & Breer, 2010). Por su lado, el órgano septal se compone de un área aislada de epitelio sensorial (ES) ubicado en la base del tabique nasal, ventralmente al epitelio olfativo (Storan & Key, 2006) y,

USC

finalmente, las células quimiosensoriales solitarias se encuentran distribuidas en la parte anterior de la cavidad nasal, pero también se ubican en otras zonas específicas como es la entrada del órgano vomeronasal (Ortiz-Leal *et al*., 2020). Los dos primeros subsistemas citados proyectan sus axones neuronales a zonas específicas del bulbo olfativo principal, mientras que los axones de las células quimiosensoriales asociadas al OVN se incorporan a las aferencias sensibles del nervio trigémino (Ogura *et al*., 2010).

En el bulbo olfativo, tanto en el principal como en el accesorio, se forman glomérulos en la zona de confluencia de los terminales axónicos de las neuronas sensoriales con las dendritas de las neuronas de segundo orden con las que establecen contacto. Los glomérulos vomeronasales forman parte del bulbo olfativo accesorio y se diferencian claramente de los glomérulos del bulbo olfativo principal por su menor tamaño y sus límites menos definidos. Sin embargo, los glomérulos formados por neuronas del ganglio de Grüneberg o del órgano septal no poseen un límite claramente diferenciado dentro del bulbo olfativo principal, aunque se han descrito zonas específicas para cada uno de ellos. De hecho, en la región caudal del bulbo olfativo principal se ha identificado un complejo de glomérulos en collar, que consta de varios grupos glomerulares específicos relacionados con la inervación de células neurosensoriales específicas, como las células del ganglio de Grüneberg o células que expresan el receptor olfativo atípico guanilil ciclasa tipo D (GC-D) (Juilfs *et al*., 1997). Adicionalmente, se han identificado unas formaciones sub-bulbares ventralmente al bulbo olfativo accesorio en ratas (Larriva-Sahd, 2012), erizos (Valverde *et al*., 1989) y en lagomorfos, -presentando en estos últimos una organización especialmente compleja (Villamayor *et al*., 2019)-, que podrían estar relacionadas con ciertas vías sensoriales específicas. La reciente caracterización del limbo olfativo -zona de transición entre los bulbos olfativos accesorio y principal- en el zorro (Ortiz-Leal *et al*., 2023) apunta a una elevada complejidad estructural y morfofuncional en la integración central de la información quimiosensorial.

Este amplio rango de versátiles quimiodetectores percibe miríadas de compuestos químicos que varían en sus propiedades fisicoquímicas y función, y que pueden estar involucrados en el control de múltiples comportamientos y respuestas fisiológicas. Esta tarea multifuncional se logra mediante una interacción orquestada entre los diversos subsistemas olfativos, cada uno de los cuales se especializa en funciones distintas y contribuye de una manera única a cumplir las abrumadoras tareas del sentido del olfato.

1.1.4.1 Subsistemas olfativos

En el **sistema olfativo principal** las moléculas se perciben mediante el contacto con la mucosa olfativa de la cavidad nasal. El componente fundamental de la mucosa olfativa es el neuroepitelio olfativo formado por neuronas sensoriales olfativas. Se trata de células bipolares cuyas dendritas alcanzan la superficie epitelial, donde mediante la presencia de largos cilios incrustados en el moco nasal proporcionan una extensa superficie para la interacción con los odorantes. Es en dichos cilios donde el proceso de neurotransducción tiene lugar (Menco, 1992). La membrana ciliar contiene proteínas receptoras y elementos de la maquinaria de

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

transducción olfativa, que hacen que estos compartimentos celulares sean quimiosensoriales, iniciando así la detección de señales.

Los receptores olfativos se componen de distintos tipos de proteínas receptoras especializadas y acopladas a la proteína G (GPCR) (Dryer & Berghard, 1999). Cada neurona sensorial olfativa expresa un único receptor de una familia que cuenta con alrededor de 1000 genes. De hecho, los receptores olfativos están asociados a la superfamilia de genes más grande en los vertebrados (Zhang & Firestein, 2002). Por otra parte, cada tipo de receptor olfativo interactúa con una amplia gama de compuestos químicos, aunque con diferentes afinidades. De tal forma que un receptor olfativo puede reconocer varios odorantes o señales químicas olfativas, y a su vez, múltiples receptores olfativos pueden reconocer un único odorante. Esta estrategia de receptor combinatorio se utiliza para codificar cualidades de olor (Malnic *et al*., 1999).

Los axones de las células neuroepiteliales olfativas convergen para formar el nervio olfativo (primer par craneal) (Crespo *et al*., 2019), cuyas fibras atraviesan la placa cribiforme del hueso etmoides para establecer su primera sinapsis en los glomérulos; formaciones esféricas presentes en la periferia de los bulbos olfativos principales. Anatómicamente, los bulbos olfativos son extensiones rostrales de los hemisferios cerebrales, y como tales pertenecen al rinencéfalo, porción olfativa del telencéfalo y constituyen, por tanto, la primera estación sináptica e integradora del sistema olfativo. Es relevante desde el punto de vista morfofuncional que todas las neuronas que expresan el mismo tipo de receptor olfativo envían sus axones a glomérulos comunes en el bulbo olfatorio principal (Mombaerts *et al*., 1996). Desde los bulbos olfativos principales, la información se transmite a través del tracto olfativo lateral hasta áreas más profundas en el cerebro (Price & Powell, 1971).

En contraste con el sistema olfativo principal, las moléculas que estimulan el **sistema vomeronasal** activan las neuronas sensoriales del órgano vomeronasal, una estructura bilateral en forma de tubo hueco que se ubica dorsalmente al suelo de la cavidad nasal y a ambos lados de la base del tabique nasal. Las características del epitelio vomeronasal que reviste el interior del conducto vomeronasal, son semejantes a las del epitelio olfativo principal, sin embargo, las dendritas de las neuronas sensoriales vomeronasales poseen microvellosidades en lugar de cilios

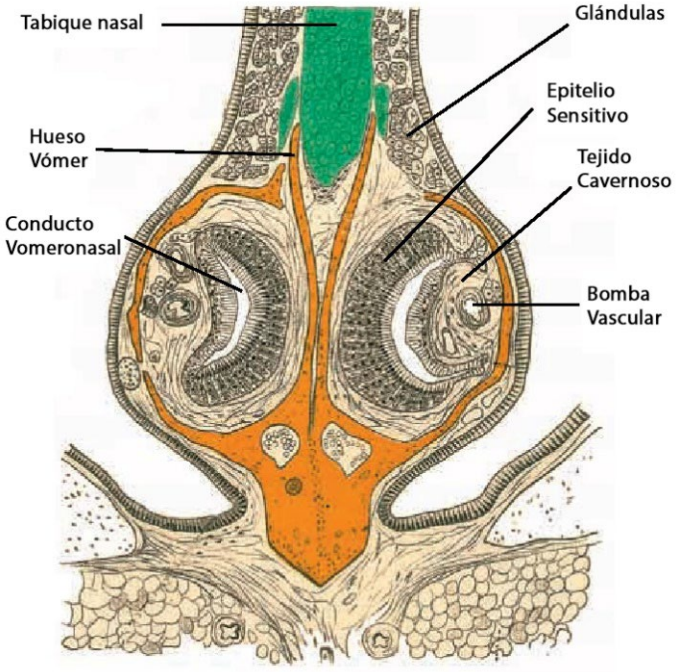

Ilustración 2. Componentes del órgano vomeronasal en una sección transversal. Fte: Døving & Trotier (1998) J Exp Biol, 201(21): 2915.

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

(Höfer *et al*., 2000). Ambos órganos vomeronasales se encuentran protegidos por una cápsula vomeronasal de naturaleza variable dependiendo de la especie, y compuesta por hueso, cartílago o una mezcla de ambos formando patrones específicos (Salazar *et al*., 1995; Villamayor *et al*., 2018). En su parte posterior, la cápsula habitualmente se encuentra cerrada, mientras que en su porción anterior el órgano vomeronasal se comunica mediante el conducto vomeronasal con la cavidad nasal o con el canal nasopalatino, dependiendo de la especie. Así, en especies como roedores, lagomorfos o algunos primates, el conducto vomeronasal desemboca directamente en la cavidad nasal (Wöhrmann-Repenning, 1984a), mientras que en otras especies como marsupiales, monotremas o ungulados, el conducto vomeronasal desemboca en el conducto nasopalatino, también llamado conducto incisivo, que conecta a las cavidades oral y nasal (Salazar *et al*., 2008). Este aspecto topográfico es un reflejo de la existencia entre las diversas especies de mamíferos de una amplia variabilidad del órgano vomeronasal, tanto a nivel morfológico y topográfico como funcional. Paralelamente al sistema olfativo principal, las terminaciones axónicas de las neuronas sensoriales vomeronasales forman el nervio vomeronasal, que a su vez, tras abandonar el interior del OVN, cursa en sentido dorsocaudal para penetrar en la placa cribiforme del hueso etmoides hasta llegar al bulbo olfativo accesorio, constituyendo su capa más superficial, la capa nerviosa vomeronasal. Desde los bulbos olfativos accesorios la información es transmitida a regiones del sistema nervioso central implicadas en mediar las respuestas feromonales expuestas al principio de esta introducción (Wysocki, 1979).

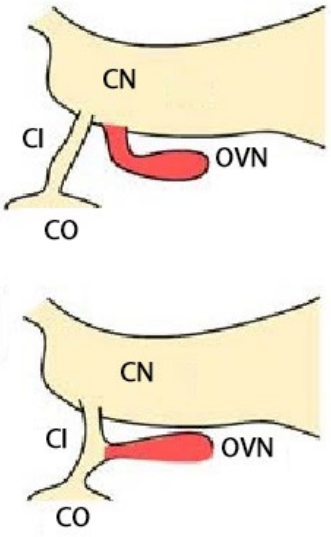

Ilustración 3. Modelos de OVN según la desembocadura del conducto vomeronasal. Abreviaturas: (CI) Conducto Incisivo; (CN) Cavidad Nasal; (CO) Cavidad Oral; (OVN) Órgano Vomeronasal. Fte: Yokosuka (2012) Exp Anim. 61(1): 14.

A menudo se ha formulado la hipótesis de que los diferentes subsistemas olfativos son funcionalmente independientes, una idea que en el caso del sistema olfativo principal y el sistema vomeronasal está respaldada por el hecho de que, mientras las neuronas olfativas se proyectan hacia el bulbo olfativo principal, las neuronas vomeronasales se proyectan al bulbo olfativo accesorio. De hecho, en ambos casos se han descrito patrones de aferencia altamente específicos. Así, en el sistema vomeronasal de los roedores, las regiones apical y basal del neuroepitelio vomeronasal proyectan sus axones al bulbo olfativo accesorio anterior y posterior respectivamente (Salazar & Sánchez-Quinteiro, 2003). En paralelo, se han determinado varias zonas concretas de neuroepitelio sensorial en la cavidad nasal que se corresponden con regiones específicas del bulbo olfativo principal. Inicialmente se establecieron cuatro zonas, sin que exista solapamiento entre ellas (Ressler *et al*., 1993) sin embargo estudios más recientes discriminan hasta nueve zonas, con una superposición variable entre ellas (Zapiec & Mombaerts, 2020). Actualmente, la información obtenida sobre el sistema olfativo y el sistema vomeronasal respalda la idea de que son entidades únicas, con características estructurales y tareas quimiosensoriales particulares, pero que sin embargo presentan una serie de aspectos morfofuncionales comunes a ambos sistemas. Entre ellos destaca la presencia de receptores

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

vomeronasales en el MOE y viceversa (Trinh & Storm, 2003; Hohenbrink *et al*., 2013) y la convergencia de las proyecciones secundarias de ambos sistemas en el telencéfalo basal (Pro-Sistiaga *et al*., 2007).

El **ganglio de Grüneberg** está formado por un grupo bilateral y compacto de neuronas situadas en el vestíbulo de la cavidad nasal anterior, en una ubicación dorsomedial próxima a la abertura de las fosas nasales (Grüneberg, 1973). Las neuronas sensitivas del ganglio de Grüneberg se encuentran inmersas en una red de fibroblastos entre el tabique nasal y el epitelio escamoso queratinizado permeable al agua que recubre el vestíbulo nasal (Fleischer *et al*., 2006). De hecho, estas neuronas que cuentan con diversos receptores no tienen dendritas o microvellosidades prominentes ni acceden directamente a la luz nasal, aunque poseen numerosos cilios que juegan un papel en la transducción sensorial (Breer *et al*., 2006). Periféricamente, células gliales envuelven las neuronas atrapando los cilios dentro del ganglio. Mediante la detección de la expresión de la proteína marcadora olfativa (OMP) se observa como sus axones se proyectan a lo largo del tabique nasal para acabar constituyendo glomérulos en un área específica del bulbo olfativo principal, el complejo de glomérulos en collar (Shinoda *et al*., 1989). Aunque este subsistema presenta diferencias morfológicas y funcionales entre distintas especies de roedores, está principalmente implicado en la termodetección y en el reconocimiento de señales de alerta volátiles, como feromonas de alarma y olores de depredadores. Sin embargo, dependiendo de la morfología estructural, de las proteínas de señalización expresadas y del contexto etológico, las diversas especies de roedores presentan diferencias de sensibilidad debido a la presión ambiental y evolutiva (Brechbühl *et al*., 2014). Estos hallazgos junto con la posición rostral única de este subsistema sugieren que el ganglio de Grüneberg está especializado en la detección temprana de señales biológicamente relevantes con el objetivo de evitar peligros potenciales.

El **órgano septal** es un área bilateral de neuroepitelio sensitivo que se ubica en la base del tabique nasal, ventralmente al epitelio olfativo principal y rostralmente a las coanas (Rodolfo-Masera, 1943). Morfológicamente, se compone de células basales, células de sostén y neuronas sensitivas ciliadas con somas aplanados y dendritas acortadas (Barrios *et al*., 2014). El órgano septal proyecta sus axones neuronales hacia ciertos glomérulos presentes en la región posterior del bulbo olfativo principal, concretamente en la zona ventromedial (Tian & Ma, 2004). Por otra parte, aunque el patrón de proyección del órgano septal ya se encuentra definido en los recién nacidos, durante los primeros días posnatales se produce un aumento significativo en el área del órgano (Weiler & Farbman, 2003) y en el número de glomérulos septales (Ma *et al*., 2003). En base a la ubicación del órgano septal, se ha sugerido que puede cumplir una función de alerta, detectando olores en el ambiente cuando se respira de forma relajada y la corriente de aire no llega al epitelio olfativo principal. De hecho, el órgano septal puede responder a algunos olores con mayor sensibilidad que el epitelio olfativo principal (Marshall & Maruniak, 1986) y ambos comparten las principales vías de transducción de señales olfativas. Otra posibilidad sugerida es que pueda desempeñar un papel en la detección de compuestos de baja volatilidad transferidos mediante el lamido, los cuales alcanzan el órgano vomeronasal y el órgano septal,

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

pero no el epitelio olfativo principal (Wysocki *et al*., 1980). Así, el órgano septal podría detectar tanto olores como señales químicas con influencia sociosexual.

Finalmente, se ha identificado otro subsistema olfativo independiente conformado por **células quimiosensoriales solitarias**. La mayoría de estas células sensoriales se localizan en la cavidad nasal anterior, pero también existe un acúmulo en el conducto de entrada del órgano vomeronasal (Ortiz-Leal *et al*., 2020), y otras poblaciones presentes en la laringe y en las vías respiratorias más profundas (Tizzano *et al*., 2011). Al mismo tiempo, se observan fibras del nervio trigémino próximas a las células quimiosensoriales solitarias, lo que indica una transmisión de información sensorial hacia dichas fibras. El tracto respiratorio superior es asaltado continuamente por sustancias nocivas y xenobióticos arrastrados por el flujo de aire inspiratorio que son detectadas por el nervio trigémino, el cual evoca reflejos protectores como estornudos, apnea e inflamación local de la mucosa. Asimismo, ciertos patógenos e irritantes inhalados estimulan las células quimiosensoriales solitarias, que contribuyen a mejorar las capacidades de respuesta química del nervio trigémino. Asimismo, las células quimiosensoriales solitarias desempeñan un papel importante en la regulación del acceso de sustancias químicas en el órgano vomeronasal (Ogura *et al*., 2010), y de este modo, proporcionan un mecanismo para identificar de forma temprana los posibles irritantes ambientales. El hecho de que individuos anósmicos o animales que carecen de sistemas olfativos funcionales conserven la capacidad de detectar una variedad de irritantes químicos a través del sistema trigémino, confirman el importante papel desempeñado por este sistema en la quimiosensación nasal (Silver & Moulton, 1982).

1.2 SISTEMA VOMERONASAL

El sistema vomeronasal (SVN) o sistema olfativo accesorio está especializado en la detección de señales químicas, fundamentalmente feromonas, cairomonas y moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, y constituido por un conjunto de estructuras anatómica e histológicamente diferenciables del sistema olfativo principal. Está presente en la mayoría de los reptiles (Filoramo *et al*., 2009; Kondoh *et al*., 2023) y anfibios (Reiss & Eisthen, 2008), pero se encuentra especialmente desarrollado en mamíferos, en los que este sistema quimiosensorial consta de tres componentes principales: el órgano vomeronasal (OVN), que actúa como órgano quimiorreceptor periférico que detecta señales químicas; el nervio vomeronasal, que transmite la información hasta el cerebro y el bulbo olfativo accesorio (BOA), primer centro nervioso donde se procesa e integra la información vomeronasal aferente antes de dirigirse a áreas específicas del SNC (Monti-Bloch *et al*., 1998).

La notable diversidad funcional del sistema vomeronasal encuentra su expresión en la existencia de tres subpoblaciones distintas de neuronas sensoriales vomeronasales. Cada una de ellas está asociada a una familia concreta de receptores quimiosensoriales: receptores vomeronasales tipo 1 (V1R), receptores vomeronasales tipo 2 (V2R) y receptores de péptidos de formilo (FPR) (Tirindelli, 2021). Sin embargo, es crucial tener en cuenta que no todas las

especies de mamíferos presentan receptores funcionales en las tres familias, lo que indica una diversidad en la detección de señales químicas y una adaptación especializada en función de las necesidades biológicas y ecológicas de cada especie. Este fenómeno subraya la riqueza y la versatilidad de este sistema en la detección y procesamiento de señales químicas, y resalta la importancia de la comunicación química en la vida de los mamíferos.

Para identificar estas familias de receptores, el estudio de las proteínas G fue crucial. En un inicio, y mediante el análisis de la expresión de las proteínas Gαo y Gαi2 en la rata, se observó que las terminaciones nerviosas de las células neurorreceptoras vomeronasales del BOA se organizaban en dos regiones complementarias (Shinohara *et al*., 1992). Posteriormente, se determinó la participación de ambas proteínas G en la cadena de transducción de las neuronas vomeronasales y se descubrió la familia de receptores V1R en ratones (Dulac & Axel, 1995). En ese momento se observa como el patrón de expresión de los receptores V1R coincide con el de la proteína Gαi2. Sin embargo, la segunda familia de receptores vomeronasales no se identificó hasta pasados dos años, cuando tres investigaciones diferentes que examinaban la expresión de la proteína Gαo en el OVN, demostraron simultáneamente la existencia de la segunda familia de receptores vomeronasales V2R (Herrada & Dulac, 1997; Matsunami & Buck, 1997; Ryba & Tirindelli, 1997). Por último, se identificó la tercera familia de receptores vomeronasales, los receptores de péptidos formilados (FPR), que se coexpresan con ambas proteínas G (Gαi2 y Gαo) (Riviere *et al*., 2009). Por otro lado, cada población neuronal mantiene un patrón de proyección específico al BOA, y a pesar del menor número de tipos de receptores vomeronasales frente a los receptores olfativos, los patrones de proyección de las neuronas receptoras vomeronasales a múltiples glomérulos del BOA parecen ser más complejos que los del sistema olfativo principal (Brennan, 2001).

Respecto al papel que cumple el sistema vomeronasal, éste es el principal encargado de la percepción de feromonas, aunque también percibe otro tipo de señales químicas no feromonales, como es el caso de las cairomonas, las cuales median en el comportamiento defensivo (Papes *et al*., 2010), u otros tipos de señales químicas que son vitales para el seguimiento de presas y el comportamiento de ataque como sucede en reptiles (Halpern & Kubie, 1984) y anfibios urodelos (Placyk & Graves, 2002). Finalmente, en mamíferos el SVN también influye en la preferencia por el alimento (Halpern *et al*., 2005).

Los estímulos químicos que muchas veces están contenidos en depósitos de orina, secreciones vaginales, secreciones de las glándulas odoríferas o en la saliva, pueden ser investigados por contacto directo, pero también se emplean comportamientos específicos como el aseo facial y el "flehmen" para facilitar la entrada de sustancias no volátiles en el OVN. La conducta del "flehmen" se aprecia en ungulados y felinos, y consiste en la adopción de una postura facial concreta, con la cabeza dirigida hacia atrás, la boca ligeramente abierta, el labio superior evertido y el cuello extendido durante unos segundos (Dagg & Taub, 1970; Estes, 1972). Habitualmente se produce después del contacto con secreciones biológicas de congéneres, y los machos muestran un mayor empleo de este comportamiento (Hart, 1983; Hart & Hart, 2023).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Respecto a la cronología sobre la investigación del SVN, el interés histórico por este sistema se inició con el descubrimiento del OVN por el anatomista danés Ludvig Levis Jacobson a principios del siglo XIX, quien describe sus características macroscópicas clave en un amplio número de mamíferos no humanos (Jacobson, 1813). No obstante, aunque previamente se habían realizado ilustraciones mostrando la supuesta ubicación del OVN en dibujos del tabique nasal humano (Ruysch, 1703; Bhatnagar & Smith, 2003), Jacobson informó de la ausencia de esta estructura en el *Homo sapiens*. Sin embargo, posteriormente se descubre el OVN humano en embriones (Dursy, 1869), y se realiza una primera descripción histológica detallada tanto en el feto como en el adulto (Kölliker, 1877). Aunque Jacobson también había contemplado la hipótesis de una posible función sensorial del órgano, sugirió principalmente un papel secretor. Las contribuciones histológicas de Balogh (1860), Klein (1881) y Piana (1882) recuperaron la hipótesis de la función sensorial, pero sólo a finales del siglo XIX, la disponibilidad de la técnica de Golgi mostró de forma definitiva la similitud morfológica de las neuronas de los epitelios olfativo y vomeronasal de la serpiente, estableciendo así la función sensorial del OVN (Retzius, 1894). Por otro lado, aproximadamente medio siglo después del descubrimiento del OVN, se produce la identificación del BOA en la oveja por Balogh (1860) mediante la trazabilidad y disección del nervio vomeronasal. Sin embargo, el término BOA es acuñado por Von Gudden, (1870) a raíz de sus estudios de los nervios vomeronasales en el conejo. Posteriormente, el anatomista Santiago Ramón y Cajal realiza una descripción detallada, precisa y específica del BOA en varios mamíferos, exponiendo su arquitectura laminar y la presencia de diferentes tipos celulares (Cajal, 1902). Sería el neuroanatomista norteamericano Rollo McCotter (1912) quien establece en un amplio rango de especies la diferente naturaleza de los nervios olfativos y vomeronasales y sus respectivos destinos en el BOP y BOA. Finalmente, en la segunda mitad del siglo XX se establece una clara relación entre el SVN y el comportamiento reproductivo (Whitten, 1956; Vandenbergh, 1969; Powers & Winans, 1975).

Evolutivamente, el sistema vomeronasal se ha asociado con el paso de los vertebrados al ambiente terrestre; sin embargo, las evidencias surgidas en los últimos años indican que existe un SVN precursor en los peces teleósteos, y que su origen evolutivo es anterior a la separación entre teleósteos y tetrápodos (Grus & Zhang, 2006). A esto se suma el caso particular de varias especies de peces pulmonados que cuentan con un sistema vomeronasal homólogo al de los mamíferos, presentando un órgano vomeronasal y un bulbo olfativo accesorio bien definidos (González *et al*., 2010; Nakamuta *et al*., 2012, 2023; Wittmer & Nowack, 2017). De este modo, la relevancia de la comunicación química es una constante a lo largo de la historia evolutiva de los vertebrados, lo que se traduce en variaciones morfofuncionales considerables entre los sistemas quimiosensoriales de las distintas especies. Concretamente, la transición de la vida acuática al medio terrestre produjo cambios que han tenido un gran efecto en la comunicación mediante feromonas en los vertebrados. Esto se debe al cambio de su propiedad química clave, de solubilidad a volatilidad, proceso que modificó los mecanismos de liberación de feromonas lo cual a su vez se vio acompañado por cambios morfológicos y fisiológicos en los órganos sensoriales (Swaney & Keverne, 2009).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Posteriormente, ciertas especies animales terrestres volvieron al medio acuático, como los cetáceos, que experimentaron cambios drásticos en su morfología olfativa mediante dicha migración. Mientras sus parientes terrestres, incluidos los hipopótamos, presentan un OVN definido (Pihlström, 2008; Suzuki *et al*., 2018), no se ha encontrado OVN en ningún cetáceo (Breathnach, 1960); asimismo, los odontocetos también han perdido el sistema olfativo principal (McGowen *et al*., 2008). Por el contrario, las serpientes marinas, que también han evolucionado de los reptiles tetrápodos terrestres, presentan un SVN subacuático funcional y bien desarrollado, mientras que han perdido el sistema olfativo principal (Kishida, 2021). En las serpientes, se ha considerado ampliamente que el sistema vomeronasal es el sistema quimiosensorial predominante (Halpern, 1992; Schwenk, 1995), y el fracaso de la adaptación de su sistema olfativo a la vida acuática frente al éxito de adaptación que presentó su sistema vomeronasal confirma la importancia y el desarrollo del SVN en estos reptiles. Otros reptiles con hábitos principalmente acuáticos como las tortugas marinas poseen un SVN bien desarrollado (Hatanaka & Matsuzaki, 1993), en cambio, aunque algunos embriones de caimanes y cocodrilos muestran SVN, este involuciona hasta estar ausente en la edad adulta (Parsons, 1959; Parsons, 1967). Sin embargo, la mayor parte de los reptiles (Houck, 2009) y anfibios (Eisthen, 2000) presentan un SVN funcional.

Respecto a los vertebrados aéreos, no hay evidencia de comunicación feromonal en la mayor parte de las aves debido a que su SVN está ausente (Silva & Antunes, 2017). Lo mismo sucede en muchos murciélagos, aunque ciertas especies poseen un SVN particularmente bien desarrollado (Bhatnagar & Meisami, 1998).

Finalmente, la gran mayoría de los mamíferos terrestres cuentan con un SVN funcional, y algunos de ellos, como los roedores, lagomorfos o marsupiales, cuentan con un SVN especialmente desarrollado. También mamíferos con hábitos semiacuáticos como el capibara (Suárez *et al*., 2011), el hipopótamo (Kondoh *et al*., 2017a), el castor (Tomiyasu *et al*., 2022) o el ornitorrinco presentan SVN (Grus *et al*., 2007).

Dentro de los primates, se cree que el último ancestro común con un sistema vomeronasal funcional pudo haber sido pequeño, arbóreo y nocturno (Cartmill, 1974; Heesy & Ross, 2001). Al no disponer de luz, la visión se encuentra limitada y la dependencia de las señales olfativas cobra más importancia (Wang *et al*., 2010). Actualmente, podemos clasificar a los primates en estrepsirrinos y haplorrinos, atendiendo a la presencia o ausencia de rinario: zona de piel húmeda sin pelo que presentan alrededor de las fosas nasales algunos mamíferos. Los estrepsirrinos, que incluyen lemúridos y loris, tienen rinario y hábitos nocturnos, además de un elevado desarrollo del SVN (Garrett *et al*., 2013). Por otro lado, los haplorrinos no presentan rinario y en su mayoría son diurnos. Incluyen a los llamados monos del Nuevo Mundo o platirrinos, y a los monos del Viejo Mundo o catarrinos, entre los que se encuentran los grandes simios y el ser humano. En cuanto al sistema vomeronasal, los monos platirrinos poseen un órgano vomeronasal bien desarrollado (Smith *et al*., 2011). En paralelo, el OVN de los primates catarrinos está generalmente ausente, sin embargo, en ciertos individuos de chimpancé y humano se ha observado un OVN rudimentario en la etapa postnatal. En ambas especies, sus

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

OVN cuentan con una posición superior y unas características histológicas concretas que difieren de las mostradas por los prosimios y primates del Nuevo Mundo (Smith *et al*., 2001).

En el caso del ser humano, tradicionalmente se pensó que su SVN degeneraba al final de la vida fetal, por lo que solo ocasionalmente se podían encontrar restos vestigiales en adultos. Esto concordaba con un primate catarrino de hábitos diurnos. Asimismo, las características concretas de su OVN en el adulto aumentaron la complejidad a la hora de encontrar dichas estructuras. En la actualidad, se reconoce la funcionalidad del SVN humano en la fase prenatal, aunque su presencia vestigial en adultos y su nivel de funcionalidad en la fase posnatal siguen siendo materia de discusión (Smith *et al*., 2014).

1.2.1 Neuroanatomía del órgano vomeronasal

El órgano vomeronasal está formado por dos estructuras tubulares ubicadas bilateralmente en la base del tabique nasal anterior. Ambos órganos presentan un único punto de comunicación con el exterior que, dependiendo de la especie, se puede localizar o bien en el conducto nasopalatino o incisivo -conducto que comunica las cavidades oral y nasal a través de la fisura palatina- o directamente en la cavidad nasal (Zancanaro, 2014).

Cada órgano consta de tres elementos claramente diferenciados: el **conducto vomeronasal**, que forma la luz del órgano y se encuentra revestido por un epitelio pseudoestratificado cilíndrico; el **parénquima**, formado por un acúmulo de tejido blando asociado al conducto, muy rico en glándulas, vasos, nervios y tejido conjuntivo (Salazar & Sánchez-Quinteiro, 1998) y la **cápsula vomeronasal**, una envoltura rígida y protectora de naturaleza ósea o cartilaginosa según la especie (Salazar *et al*., 1995).

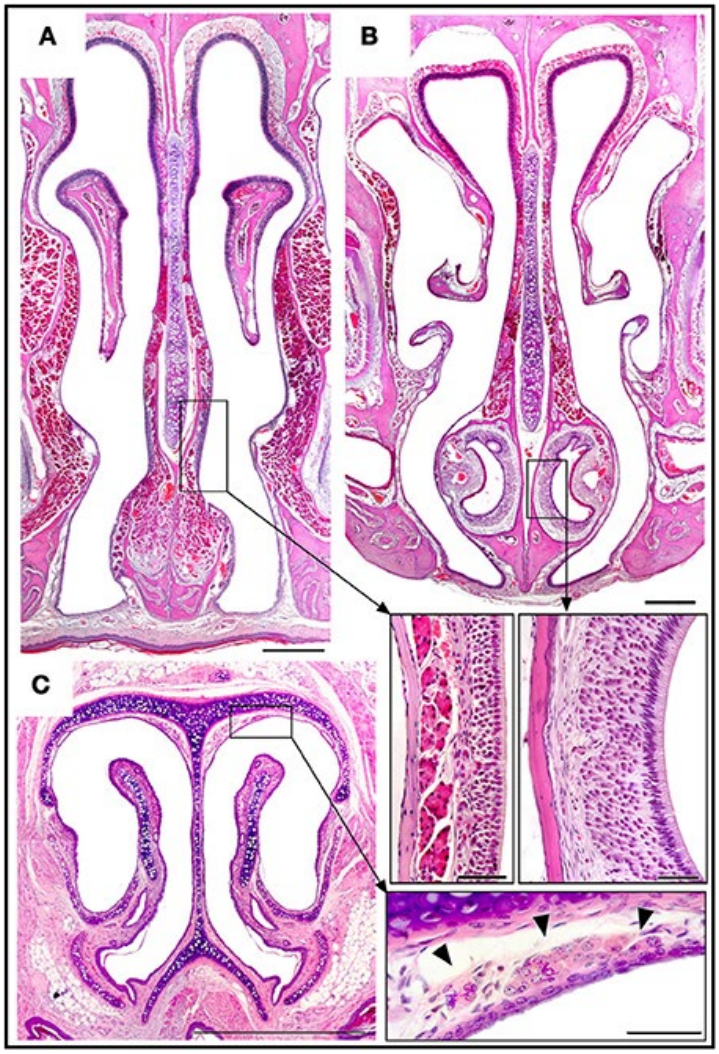

Ilustración 2. Imagen histológica de los subsistemas sensoriales olfativos del ratón. (A) Órgano septal. (B) Órgano vomeronasal. (C) Ganglio de Grüneberg. Secciones transversales de la cavidad nasal teñidas con hematoxilina-eosina. Fte: Barrios et al. (2014) Front Neuroanat. 8(63): 5. Reproducida bajo licencia CC BY.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Al practicar un corte transversal en la parte central del órgano, se observa la forma típica de media luna que presenta el lumen del conducto en dicho nivel. Internamente, el conducto se encuentra revestido en toda su superficie por dos epitelios diferenciables. En su cara lateral presenta un epitelio respiratorio pseudoestratificado y ciliado, mientras que en su parte medial se ubica el epitelio sensorial vomeronasal (Døving & Trotier, 1998). Este epitelio sensorial se compone de un fino estrato de células basales, un amplio estrato central de células neuroreceptoras bipolares y una capa externa de células sustentaculares que dan soporte a los procesos dendríticos de las células neuroreceptoras. Estos procesos se proyectan hacia el lumen. A ese nivel forman microvellosidades que contienen los receptores vomeronasales, responsables de reconocer las moléculas implicadas en la quimiocomunicación (Menco *et al*., 1997; Menco *et al*., 2001).

Los fascículos nerviosos del parénquima se constituyen por la coalescencia en fascículos de los procesos axonales de las células neurorreceptoras, los cuales convergen desde el epitelio vomeronasal. Estos haces nerviosos se localizan en las zonas dorsal y medial del OVN, aunque ocasionalmente también pueden discurrir por la cara ventral o lateral del conducto. A su vez, estos haces confluyen constituyendo el nervio vomeronasal, que cursa dorsocaudalmente en la submucosa del tabique nasal (Salazar *et al*., 2006). Tras atravesar la lámina cribosa del etmoides por su parte medial el nervio vomeronasal se proyecta hacia el área anterior del telencéfalo para hacer sinapsis en el bulbo olfativo accesorio (Jungblut *et al*., 2013).

En la zona central del OVN, tanto el componente glandular como el componente vascular del parénquima se ubican mayoritariamente en la porción lateral del parénquima. Por su parte, el tejido glandular también se concentra en la parte caudal del OVN. Las glándulas vomeronasales (GV) se encargan de secretar el moco que se vierte a la luz del conducto, a nivel de sus comisuras o bien en la parte central del epitelio respiratorio (Mendoza & Kühnel, 1987). La mucosidad facilita la entrada y salida de moléculas al interior del conducto, pero asimismo juega un papel crucial en los procesos perirreceptores vomeronasales. Histológicamente, estas glándulas se diferencian por su morfología acinar o tubular, y por sus secreciones serosas o mucoides respectivamente (Takami *et al*., 1995; Kondoh *et al*., 2020). Respecto al tejido vascular del OVN, únicamente se pueden encontrar arterias de un calibre significativo en su parte posterior, sin embargo, presenta grandes venas que discurren en paralelo al conducto vomeronasal por el flanco lateral (Salazar *et al*., 1997a). Esta organización morfológica tan característica es importante ya que interviene en el mecanismo de bombeo vascular que se activa para permitir la entrada de estímulos químicos al órgano. En concreto, cuando los vasos del parénquima se contraen se expande la luz del conducto, generándose un efecto de vacío que absorbe a las moléculas químicas hacia el interior del conducto. Análogamente, cuando los vasos se dilatan, se produce una constricción del conducto que expulsa el contenido del conducto al exterior. Este mecanismo de bombeo vascular se conoce como bomba vomeronasal (Eccles, 1982; Meredith & O'Connell, 1979; Meredith, 1994).

La cápsula vomeronasal proporciona un soporte estructural para el correcto funcionamiento de la bomba vascular, oponiéndose al colapso del parénquima que el

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

incremento de la presión negativa podría provocar, y al mismo tiempo protege las estructuras que encierra. Su morfología no sólo se va modificando a lo largo del OVN, sino que existen muy llamativas variaciones entre las distintas especies, tanto en su naturaleza como en su conformación (Salazar *et al*., 1995). De forma más habitual, anteriormente, la cápsula presenta forma de anillo incompleto con una abertura lateral relacionada con la desembocadura del conducto vomeronasal. En la parte central el anillo se completa, pero en la parte posterior la cápsula se vuelve a separar adoptando forma de "J", con una hendidura dorsolateral que permite el paso de los nervios vomeronasales. A medida que avanzamos caudalmente, en ocasiones el anillo se cierra completamente. Su naturaleza puede ser ósea, cartilaginosa o una combinación de ambas en diferentes patrones, siendo uno de los componentes del OVN con un diseño más diverso desde el punto de vista de la anatomía comparada.

Respecto a la transducción sensorial del OVN, en el modelo más estudiado, el murino, las células neurorreceptoras se organizan en diferentes subpoblaciones a lo largo del epitelio vomeronasal siguiendo una zonación claramente definida. De este modo, los receptores V1R, ligados a la proteína Gαi2, se circunscriben a las neuronas cuyos somas se localizan en la parte apical del epitelio, mientras que las neuronas que expresan los receptores V2R, ligados a la proteína Gαo, localizan sus somas en la capa basal del epitelio sensorial vomeronasal (Halpern *et al*., 1998). En ambos casos, cada célula neuroreceptora expresa de forma exclusiva un único receptor entre la población total de receptores vomeronasales (Matsunami & Buck, 1997). Los receptores de péptidos formilados se coexpresan con ambas proteínas G en las dos capas nerviosas. Por otro lado, se ha demostrado que los péptidos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) son capaces de percibir moléculas no volátiles, tanto en el epitelio olfativo como en el vomeronasal de los mamíferos. Esto sugiere un papel general de los péptidos del CMH en la comunicación química, incluso en especies carentes de un OVN funcional (Spehr *et al*., 2006).

La cascada de transducción de prácticamente todas las neuronas vomeronasales converge, en la mayoría de las especies, en la activación de un miembro de la familia de canales de potencial receptor transitorio (TRP), el TRPC2, que se expresa en ambas capas neuronales del OVN (Liman *et al*., 1999). De hecho, la secuencia genómica del gen TRPC2 intacto se considera un marcador predictivo de la funcionalidad del órgano vomeronasal (Silva & Antunes, 2017). En humanos se confirmó la pérdida de un gen TRPC2 funcional, sin embargo, se ha observado la presencia de receptores V1R funcionales en la mucosa olfativa (Rodriguez *et al*., 2000). Asimismo, conviene señalar que la comunicación química en los vertebrados se originó mucho antes que el desarrollo del OVN, y que la detección de feromonas también puede estar mediada por otros órganos olfativos (Baum & Kelliher, 2009).

Aunque en un inicio se pensó que todos los mamíferos expresaban ambas familias de receptores vomeronasales, posteriormente se describió la ausencia de la familia V2R en el sistema vomeronasal de varias especies. Por ello, en base a la presencia o ausencia de las dos subpoblaciones neuronales ligadas a los receptores vomeronasales V1R y V2R, se identificaron dos modelos de transducción vomeronasal: el modelo segregado y el modelo uniforme. De este

USC

modo, en el modelo segregado coexisten ambos tipos de receptores vomeronasales, mientras que en el modelo uniforme el receptor V2R está ausente, y solo se expresan neuronas del tipo V1R. Recientemente, una investigación en el ualabí de Tammar (*Notamacropus eugenii*) concluyó que los macropódidos podrían presentar un tercer modelo de transducción vomeronasal, constituido únicamente por neuronas V2R, al no encontrar expresión de la proteína Gαi2 en el OVN ni en el BOA (Schneider *et al*., 2012).

Se ha caracterizado un sistema vomeronasal del tipo segregado en ciertas especies de roedores (Suárez & Mpodozis, 2009), lagomorfos (Villamayor *et al*., 2018) y marsupiales (Halpern *et al*., 1995), mientras que el resto de los mamíferos investigados, tales como ungulados, carnívoros o primates, se encuentran dentro del modelo uniforme (Young & Trask, 2007; Salazar *et al*., 2013; Moriya-Ito *et al*., 2018).

Como hemos visto, el estudio neuroquímico del órgano permite obtener características sobre la funcionalidad mediante el empleo de las proteínas G, pero también se emplean otros marcadores que aportan información específica de esta estructura. Las proteínas ligantes de calcio calbindina (CB) y calretinina (CR) se utilizan para identificar sustancias neuroactivas, pero también para diferenciar poblaciones celulares o para definir la morfología de las células neurorreceptoras vomeronasales (Kishimoto *et al*., 1993). Por otra parte, el marcador GAP-43 muestra el crecimiento neuronal y se expresa en los fascículos nerviosos presentes en el órgano (Verhaagen *et al*., 1989). Estos marcadores se complementan con tinciones rutinarias (hematoxilina-eosina) o tinciones específicas (tricrómico de Gallego), que muestran las características estructurales del OVN. Igualmente, mediante las tinciones PAS (Peryodic acid Schiff) y Azul alcián se puede identificar la naturaleza de las glándulas vomeronasales, tiñendo éstas las secreciones con mucopolisacáridos neutros y ácidos respectivamente (Salazar & Sánchez-Quinteiro, 1998).

Asimismo, en el estudio del OVN se emplean lectinas como *Ulex europaeus* agglutinin (UEA), *Bandeiraea simplicifolia* isolectin B_4 (BSI-B_4) o *Lycopersicon esculentum* agglutinin (LEA), ya que algunas de ellas son específicas del sistema vomeronasal y/o del sistema olfativo en diversos mamíferos (Ichikawa *et al*., 1992). De este modo, se pueden diferenciar poblaciones neuronales y estudiar la morfología de las células neurorreceptoras en el epitelio sensorial del OVN. Por otro lado, al expresarse en los axones neuronales de dichas células, resulta más sencillo identificar los fascículos nerviosos del OVN y realizar un seguimiento del nervio vomeronasal analizando su topografía y relaciones anatómicas.

Mediante el estudio genómico se determinó la extraordinaria variabilidad que presenta el tamaño de los repertorios de genes V1R y V2R entre las diferentes especies (Shi & Zhang, 2007). Por otra parte, el análisis del transcriptoma en el OVN de ratones con diferentes condiciones fisiológicas y ambientales mostró variaciones notables en la expresión de los receptores vomeronasales incluso entre individuos de la misma especie (Oboti *et al*., 2015; Villamayor *et al*., 2021, 2022).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La diversidad morfológica que presenta el OVN entre los diferentes órdenes de mamíferos también es notoria, y de hecho, ya desde la aparición de la teoría de la evolución de Darwin, la conformación morfológica del OVN se empleó como método de clasificación filogenético (Broom, 1900; Wöhrmann-Repenning, 1984a; Sánchez-Villagra, 2001).

Gran parte de los estudios sobre el SVN se han realizado en roedores, concretamente en especies de miomorfos como la rata de laboratorio (*Rattus norvegicus domestica*) o el ratón (*Mus musculus*), que se han empleado como modelo general de SVN en roedores. Ambas especies exhiben un órgano vomeronasal muy desarrollado, con un gran epitelio neurorreceptor, de amplio espesor y densa celularidad (Vaccarezza *et al*., 1981). La bomba vascular se encuentra formada principalmente por una gran vena central, que se encuentra rodeada de otras venas de menor diámetro (Mechin *et al*., 2021). La cápsula vomeronasal está formada por una fina lámina ósea en adultos, sin embargo, la naturaleza de esta envoltura es cartilaginosa en ratas recién nacidas (Salazar & Sánchez-Quinteiro, 1998).

Otros roedores miomorfos muestran características morfológicas específicas en su OVN, en cambio, todos presentan un nivel de desarrollo equiparable. Por ejemplo, la rata de Gambia (*Cricetomys gambianus*), muestra ciertas áreas de osificación en su cápsula vomeronasal cartilaginosa (Igbokwe & Nwaogu, 2009). Dentro de los roedores esciuromorfos, la ardilla terrestre dauriana posee una vena excepcionalmente voluminosa, que constituye junto con otras venas de calibre reducido, la bomba vascular. Asimismo, muestra un epitelio sensorial con un elevado grosor y su cápsula vomeronasal es exclusivamente cartilaginosa (Wang *et al*., 2021). En roedores histricomorfos, la chinchilla de cola larga (*Chinchilla lanigera*) mostró una variación considerable en las características principales de su OVN. Su epitelio sensorial pasa de una ubicación medial en la parte anterior del OVN, a una posición completamente dorsal en la parte posterior del mismo. Igualmente, la cápsula vomeronasal en esta especie está formada por tejido cartilaginoso en su nivel anterior, pero ésta se va desplazando dorsalmente a medida que avanzamos en sentido caudal, hasta ser remplazada en su totalidad por una lámina ósea que envuelve el OVN en su parte posterior (Oikawa *et al*., 1994). Respecto a la bomba vascular, el OVN de la chinchilla cuenta con varias venas de diámetro significativo, pero consta de una gran vena central dominante (Jurcisek *et al*., 2003). Asimismo, dentro de los histricomorfos, las ratas topo africanas mostraron características únicas en relación con su órgano vomeronasal. En estos roedores eusociales, apenas se produce crecimiento postnatal en su neuroepitelio vomeronasal (Smith *et al*., 2007), sin embargo, todos los componentes de su OVN muestran un desarrollo notable y funcional. De este modo, cuenta con un epitelio sensorial de elevado grosor y lateralmente presenta grandes senos venosos. Transversalmente, el conducto vomeronasal adopta la típica forma de "J" o media luna. El parénquima se encuentra protegido por una cápsula cartilaginosa, y a su vez, reforzado por una lámina ósea externa que ocupa una posición ventral y/o lateral según la especie (Dennis *et al*., 2020).

Al igual que sucede en roedores, los lagomorfos cuentan con un órgano vomeronasal ampliamente desarrollado. El conejo (*Oryctolagus cuniculus*) cuenta con una cápsula vomeronasal doble, compuesta por un revestimiento externo de naturaleza ósea y un

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

revestimiento interno cartilaginoso (Luckhaus, 1969; Mahdy, 2019). Su epitelio sensorial muestra un grosor comparable con el de los roedores, en cambio, su bomba vascular está compuesta por múltiples venas de gran calibre que aportan un potente poder succionador al OVN en esta especie (Elgayar *et al*., 2014, Villamayor *et al*., 2018).

Los marsupiales también muestran un extraordinario desarrollo del órgano vomeronasal, lo que sugiere que, como en roedores y lagomorfos, la comunicación feromonal presenta un papel esencial en estos mamíferos. El ualabí de Tammar (*Notamacropus eugenii*), un macropódido del orden diprotodontia, luce una cápsula cartilaginosa completa y un epitelio neurorreceptor extenso y densamente poblado. El tejido vascular que permite el mecanismo de bombeo está compuesto por numerosas venas de gran calibre, las cuales se distribuyen mayormente en el lado medial, pero también figuran venas de voluminosas en la cara medial del conducto vomeronasal (Schneider *et al*., 2008). En el orden Didelphimorphia, el colicorto gris (*Monodelphis domestica*) presenta ciertas particularidades únicas. Su cápsula vomeronasal es cartilaginosa, aunque en el nivel caudal se substituye por una cápsula ósea, que rodea el parénquima rico en tejido glandular. Su bomba vascular está compuesta por un gran vaso principal lateral al conducto vomeronasal, y otros vasos de menor calibre en las zonas ventromedial y lateral. Su epitelio sensorial muestra un elevado grosor y se caracteriza por la presencia de una estructura en forma de roseta que divide dicho epitelio a la mitad en la parte caudal del órgano. Esta conformación se corresponde con la fusión del conducto principal de secreción glandular vomeronasal con el neuroepitelio, mediante su desembocadura en el lumen del conducto vomeronasal (Poran, 1998).

En las especies del orden Monotremata, el OVN presenta un desarrollo notable. Estudios en individuos recién nacidos de ornitorrinco y equidna determinaron que ambos cuentan con un grueso epitelio sensorial y una envoltura capsular cartilaginosa. En contraste, ambos presentaron venas poco numerosas y de modesto calibre formando su bomba vascular (Schneider, 2011; Ashwell, 2012).

Dentro del orden Eulipotyphla, las especies estudiadas muestran un OVN altamente desarrollado. El erizo pigmeo africano (*Atelerix albiventris*), posee una cápsula vomeronasal cartilaginosa y un epitelio neurorreceptor de grosor moderado, que se extiende más allá de los límites habituales, ocupando prácticamente la totalidad de la luz frente al epitelio respiratorio. El parénquima contiene glándulas mucosas y serosas, y una red de senos venosos que se extiende alrededor de todo el conducto vomeronasal. Mediante un corte transversal, el lumen de su OVN muestra una forma circular en la parte anterior, que se va ovalando a medida que avanzamos caudalmente (Kondoh *et al*., 2021). Por otro lado, el OVN del antequino (*Antechinus subtropicusse*) mostró diferencias significativas respecto al erizo pigmeo africano. En esta especie la cápsula también es cartilaginosa, pero presenta una vena principal lateral al conducto vomeronasal junto con otras venas secundarias ubicadas tanto lateral como medialmente al mismo formando su bomba vascular. Por otro lado, su neuroepitelio vomeronasal presenta un notable y mayor grosor respecto al erizo pigmeo africano, sin embargo, su extensión frente al epitelio respiratorio se corresponde con el patrón habitual y la

USC

forma de su lumen mediante un corte transversal es la típica de "J" o media luna (Aland *et al*., 2016).

Los mamíferos del orden Carnivora, tanto félidos como cánidos, han mostrado un desarrollo moderado de su OVN. Estudios en el gato doméstico (*Felis silvestris catus*), oso pardo (*Ursus arctos*) y turón europeo (*Mustela putorius*) revelaron que todos comparten las principales características estructurales del OVN, tales como una cápsula cartilaginosa, la distribución de vasos alrededor del conducto vomeronasal conformando la bomba vascular y un neuroepitelio sensorial extenso, pero de menor grosor que los mamíferos de los órdenes anteriormente descritos (Salazar *et al*., 1996; Tomiyasu *et al*., 2017; Weiler *et al*., 1999). Sin embargo, el zorro común (*Vulpes vulpes*) representa una excepción dentro de los cánidos domésticos, ya que en esta especie el epitelio vomeronasal no solo se encuentra más desarrollado, sino que muestra la expresión de las proteínas G asociadas a ambos receptores V1R y V2R (Ortiz-Leal *et al*., 2020).

Los artiodáctilos también presentan un nivel medio de desarrollo del OVN. Su cápsula cartilaginosa es compleja y desarrollada, presentando numerosas diferencias morfológicas entre las diversas especies. La longitud del epitelio vomeronasal sensorial suele ser mayor frente a las especies de los órdenes ya comentados, sin embargo, su grosor es notablemente inferior como sucede en carnívoros, aunque sin dejar de presentar las tres capas celulares que conforman el neuroepitelio, las cuales se organizan mostrando un límite claramente definido. Los vasos del parénquima vomeronasal son numerosos, de calibre medio y se organizan aleatoriamente alrededor del conducto vomeronasal. Respecto a la morfología que exhibe el conducto vomeronasal en el plano transversal, los artiodáctilos suelen presentar una forma ovalada, a diferencia de la conformación habitual en media luna o "J". Asimismo, existen variaciones entre las diferentes especies (Salazar *et al*., 1997b; Salazar *et al*., 2007; Ibokwe & Okpe, 2009; Vedin *et al*., 2010; Park *et al*., 2014)

Los primates estrepsirrinos, de hábitos nocturnos en su mayoría, presentan un OVN bastante desarrollado frente a los primates haplorrinos, que suelen presentar hábitos diurnos y cuentan con un OVN de modesto desarrollo. Ambos poseen una cápsula de naturaleza cartilaginosa que rodea el parénquima vomeronasal, en cambio, el grosor del epitelio vomeronasal es significativamente mayor en estrepsirrinos. Asimismo, la bomba vascular en estrepsirrinos cuenta con numerosos vasos de gran calibre alrededor de todo el conducto vomeronasal, en contraste con los escasos vasos que generalmente muestra el OVN de los primates haplorrinos (Smith *et al*., 2002).

Entre los diversos quirópteros, el desarrollo del OVN es extremadamente variable. Desde especies que muestran una ausencia total de su OVN ya en la fase embrionaria, a otras especies que manifiestan un desarrollo asombroso de esta estructura sensitiva. Asimismo, otros muchos grupos de quirópteros representan niveles intermedios de desarrollo (Bhatnagar & Meisami, 1998).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.2.2 Neuroanatomía del bulbo olfativo accesorio

El bulbo olfativo accesorio (BOA), primer centro de integración neuronal del sistema sensorial vomeronasal, se ubica en las áreas olfativas del cerebro anterior de ciertas especies de vertebrados; lo que conocemos como el rinencéfalo basal. En el caso de los mamíferos, suele situarse en una posición dorsocaudal con respecto al bulbo olfativo principal (BOP) (Bhatnagar & Meisami, 1998).

Macroscópicamente, en la mayoría de las especies, el BOA es una estructura relativamente difícil de discriminar, pues, aunque en la mayoría de los casos suele dar lugar a una prominencia convexa en la transición dorsal entre el bulbo olfativo principal y el pedúnculo olfativo, sus límites con dichas estructuras son muy difusos. Sin embargo, histológicamente es habitualmente reconocible con facilidad debido a su morfología laminar. Aunque este patrón laminar es esencialmente análogo al que presenta el BOP, existen importantes variaciones entre los distintos grupos de mamíferos, observándose especies con una laminación claramente definida y una alta celularidad y especies con una delimitación de las capas mucho menos definida. De este modo, de superficial a profundo las capas del BOA son:

1. Capa nerviosa vomeronasal: Está integrada por haces de fibras amielínicas, procedentes de las neuronas receptoras vomeronasales, envueltas por numerosas células gliales, tanto astrocíticas como glía envolvente (Takami & Graziadei, 1990; Nakajima *et al*., 2013). Mientras que en el BOP de los mamíferos cada axón olfativo proyecta a un único glomérulo (Vassar *et al*., 1994; Mombaerts *et al*., 1996), en el BOA, las fibras se ramifican y se distribuyen a más de un glomérulo (Del Punta *et al*., 2002).

2. Capa glomerular: Constituida por unas estructuras esféricas denominadas glomérulos, resultado del contacto sináptico entre las terminaciones axónicas de las fibras nerviosas vomeronasales y las dendritas apicales de las células mitrales. Estos glomérulos muestran una textura relativamente acelular y rica en neurópilo, pero están delimitados por una banda estrecha de células periglomerulares, muy especialmente en su parte más profunda.

3. Capa plexiforme externa / Capa mitral / Capa plexiforme interna: Es a nivel de las tres capas centrales del bulbo olfativo accesorio dónde radican las mayores diferencias tanto en comparación con el BOP, como en las comparaciones interespecíficas que se puedan establecer a nivel del propio BOA. La diferenciación de una capa plexiforme externa -formada por las dendritas de las células mitrales y las células granulares, así como por células empenachadas y otros tipos neuronales-, una capa mitral -formada por una banda lineal que incluye los somas de las células mitrales, segunda neurona de la vía olfativa- y una capa plexiforme interna -que contiene los axones de las células mitrales-, es una constante en la organización del BOP de los mamíferos. Sin embargo, en el caso del BOA la existencia de los estratos plexiformes sólo ha sido planteado en aquellas especies en las que el grado de laminación es máximo, fundamentalmente los roedores,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

pero sin que la cuestión esté exenta de polémica. Así, Cajal (1902) concluyó que las capas plexiformes estaban ausentes; sin embargo, estudios comparativos clásicos del sistema olfativo (Crosby & Humphrey, 1941; Allison, 1953) incluyeron la plexiforme externa en su descripción del BOA pero no la plexiforme interna. Meisami y Bhatnagar (1998) en su exhaustiva revisión bibliográfica afirman que es inadecuado extrapolar datos de una especie a otra, indicando que en los mamíferos con BOAs grandes y bien desarrollados, ambas capas plexiformes existen, aunque reconociendo que los límites de dichas capas no son reconocibles con la tinción de Nissl, debiéndose recurrir a tinciones más específicas como la tinción de la citocromo-oxidasa o de Galyas. Sin embargo, Salazar *et al*. (2006), en su estudio exhaustivo del BOA del ratón concluyeron la imposibilidad de determinar la presencia de las capas plexiformes, así como de diferenciar las células mitrales de las empenachadas, acuñando el término capa mitral/empenachada. En su estudio posterior del BOA del gato, Salazar *et al*. (2011) optaron por el término capa mitral/empenachada/plexiforme el cual engloba de forma más ajustada a la realidad la fusión de las tres estructuras del BOA equivalentes a las tres capas internas del BOP. En posteriores trabajos, este grupo se decantó por una denominación más sencilla: capa mitral/plexiforme, la cual adoptamos nosotros a lo largo de este trabajo. Es importante clarificar que la morfología de las células principales de dicha capa mitral/plexiforme, raramente se corresponde a la morfología típicamente mitral observada en la capa mitral del BOP. Esto ha hecho que determinados autores hayan preferido evitar el término mitral al describir dicha capa, tal es el caso de Larriva-Sahd (2008) y Villamayor *et al*. (2020), en sus respectivos estudios del BOA de la rata y del conejo. En ambos casos se optó por la utilización de los términos "capa celular externa" para designar el conjunto de la capa mitral/plexiforme y "células principales" para designar las neuronas de proyección que constituyen dicha capa. Aunque sin duda es una denominación más ajustada a la realidad morfológica, la equivalencia funcional directa entre las células mitrales del BOP y las células principales del BOA (neuronas de proyección en ambos casos), aconseja mantener el término de células mitrales para designar las células principales del BOA. En cuanto a la utilización del término plexiforme, Larriva-Sahd (2008) considera que en contraste con la disposición en plexo de los procesos proximales de las células mitrales del BOP, en el caso del BOA estos procesos adoptan una disposición radial, resultando en un marco dendrítico denso y convoluto, muy diferente a la textura fibrosa paralela que forma la capa plexiforme del BOP. El conjunto de las arborizaciones dendríticas radiales, junto con los procesos proximales de las células granulares y otras interneuronas componen un neurópilo más que una capa plexiforme. Otro aspecto interesante que afecta la estratificación del BOA, es la topografía del tracto olfativo lateral (TOL), pudiendo éste estar situado a través o debajo del bulbo accesorio. Así, en amplios grupos de mamíferos entre los que se incluyen los roedores, insectívoros y primates, los amplios haces axónicos que conforman el componente dorsal del TOL cursan a través de la zona más interna de la capa mitral/plexiforme, o capa celular externa (Switzer *et al*., 1980).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4. Capa granular: Está formada por neuronas granulares, carentes de axones que se acumulan de manera compacta. Estas células son gabaérgicas y presumiblemente

inhibitorias (Baker *et al*., 1988), sin embargo, no son una población homogénea en cuanto a la expresión de neuromoduladores peptídicos (Gouda *et al*., 1990). Sus dendritas basales reciben impulsos centrífugos de la amígdala, en cambio, sus dendritas apicales interactúan con las dendritas basales de las células mitrales (McLean & Shipley, 1992). Por otro lado, se ha visto que el número de células granulares es menor en animales domésticos y animales mantenidos en instalaciones zoológicas (Frahm *et al*., 1984). Asimismo, se ha encontrado una proliferación neuronal en el BOA de la rata

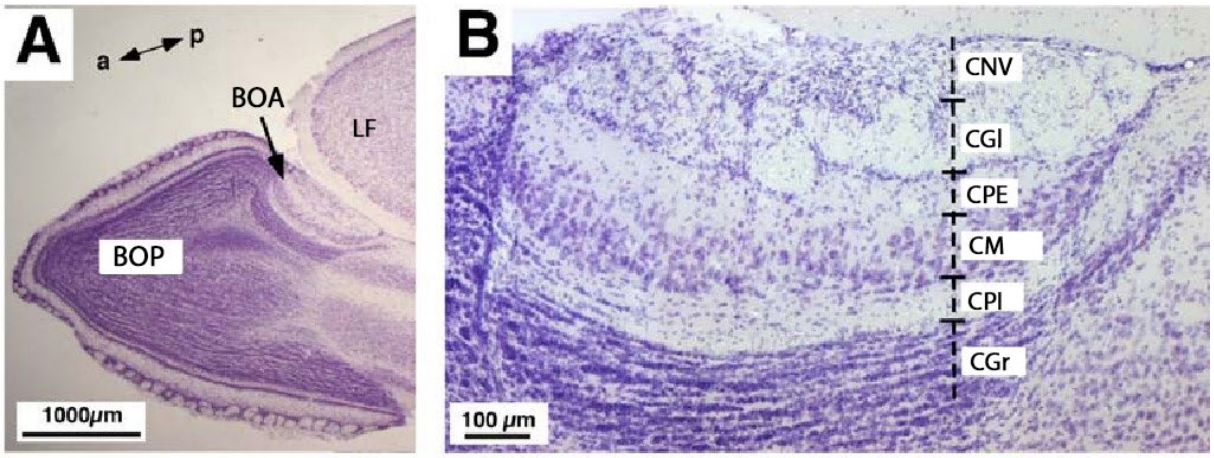

Ilustración 3. Histología del BO, ubicación y laminación del BOA (A) Sección sagital de la histología del bulbo olfativo. (B) Sección sagital del BOA mostrando sus capas. Abreviaturas: (BOA) Bulbo Olfativo Accesorio; (BOP) Bulbo Olfativo Principal; (CGl) Capa Glomerular; (CGr) Capa Granular; (CM) Capa Mitral; (CNV) Capa Nerviosa Vomeronasal; (CPE) Capa Plexiforme Externa; (CPI) Capa Plexiforme Interna; (LF) Lóbulo Frontal. Fte: Yokosuka (2012) Exp Anim. 61(1): 18.

adulta, localizándose la mayoría de estas nuevas células en la capa granular (Bonfanti *et al*., 1997). Contrariamente a lo que se podría suponer, la mayoría de las neuronas en proliferación presentes en el BO no derivan de la zona subventricular del bulbo olfativo sino de células de división lenta que podrían corresponder a la población de células madres neurales residentes, las cuales podrían generar neuronas que se incorporan en los circuitos del BO en vivo (Defterali *et al*., 2021).

Las neuronas de proyección del bulbo olfativo envían axones a través del tracto olfativo lateral (TOL), dotándolo de una estructura laminar. Así pues, en etapas embrionarias el TOL consta de tres capas: superficial, media y profunda. Los axones procedentes del BOA son los primeros en madurar, por ello se disponen en la capa profunda, en cambio, los axones que proceden del BOP constituyen los estratos medio y superficial. El estrato medio está compuesto por axones maduros, en cambio, el estrato superficial lo constituyen axones recién generados que se van agregando, y que forman una serie de láminas axonales apiladas con diferentes etapas de maduración. En un inicio, la lámina superficial es proporcionalmente más grande que la lámina media, sin embargo, a lo largo del desarrollo la lámina media se va incrementando, mientras que la lámina superficial se reduce drásticamente (Inaki *et al*., 2004). Esta segregación de ambas vías en el TOL, la vía vomeronasal y la vía olfativa, se puede apreciar en animales adultos como el conejo o la rata (Broadwell, 1975; Schwob & Price, 1984).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A lo largo de todas las capas que componen el BOA coexisten diferentes tipos celulares. De superficial a profundo, podemos encontrar células periglomerulares, neuronas superficiales de axón corto, células mitrales, células de proyección redonda, células empenachadas, células granulares externas, células enanas, neuronas poligonales y células granulares internas.

Las células periglomerulares (CPg) son pequeñas neuronas de axón corto que se encuentran en la base de los glomérulos tanto en el BOA como en el BOP, aunque en este último son más numerosas. En el BOA, estas células son principalmente gabaérgicas y poseen funciones inhibitorias con las que pueden ejercer un papel modulador (Takami *et al*., 1992). Existen dos clases de CPg: células amacrinas, es decir, que no tienen axón, e interneuronas. Ambas tienen un soma pequeño y fusiforme, desde el que envían una o dos dendritas a uno o varios glomérulos. En ellos, sus dendritas se ramifican y originan un denso plexo dendrítico. Por otra parte, el axón de las interneuronas se distribuye dentro del neuropilo adyacente a los glomérulos.

Las células superficiales de axón corto son morfológicamente similares a las CPg, sin embargo, presentan ciertas diferencias. Su tamaño es mayor y se ubican en la parte superficial de la capa plexiforme externa. Poseen una gruesa dendrita principal, que asciende hasta introducirse en un único glomérulo en el que establece una red dendrítica. Asimismo, emiten otras dendritas que se distribuyen ventralmente entre los somas de CPg y de otras células superficiales de axón corto. Finalmente, su axón se relaciona con los somas de las CPg adyacentes (Takami & Graziadei, 1990).

Las células mitrales, también llamadas principales, son la segunda neurona de la vía sensorial olfativa y vomeronasal. Mientras que en el BOP se distribuyen linealmente, formando una densa capa de células mitrales, en el caso del BOA esta capa se transforma en una banda de células mitrales difusa que está integrada con ambas capas plexiformes, para constituir una única capa mitral-plexiforme, también denominada capa celular externa. La citoarquitectura del bulbo olfativo accesorio ha sido abordada con especial profundidad en la rata a través del estudio realizado con la técnica de Golgi por Larriva-Sahd (2008), el cual demuestra como las células mitrales poseen dos tipos de dendritas: dendritas glomerulares (gruesas) y dendritas accesorias (delgadas). Las dendritas glomerulares son múltiples y se extienden hasta los glomérulos que se encuentran en su respectiva mitad del BOA, atendiendo al eje anteroposterior (Takami & Graziadei, 1991). La forma del soma de las células mitrales depende del número de dendritas glomerulares que comprenda, de este modo, su morfología será ovalada, triangular o poliédrica según presente dos, tres o más dendritas primarias respectivamente. Los axones de estas neuronas abandonan caudalmente el BOA (Larriva-Sahd, 2008).

Otro tipo celular descrito son las células de proyección redonda, que tienen forma ovalada y dendritas pareadas (Larriva-Sahd, 2008). Su axón surge de la base de una dendrita proximal y se extiende hacia el tracto olfativo lateral (TOL). Asimismo, de su axón surgen una o dos prolongaciones que desembocan en el soma o procesos dendríticos de una célula vecina.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Las células en penacho tienen forma triangular, aunque pueden presentar una morfología fusiforme. Su tamaño es ligeramente menor en comparación a las células mitrales, pero presentan una organización general de sus dendritas similar. En cambio, las células en penacho constan de una única dendrita glomerular que se une a un solo glomérulo. En estas células el axón suele surgir de la base de una dendrita no glomerular, aunque ocasionalmente nace directamente del soma. A continuación, el axón desciende en sentido ventral recorriendo una amplia trayectoria en zigzag para desembocar en la inmediación de células enanas, granulares externas o mitrales.

En la capa granular nos encontramos más superficialmente con las células granulares externas, neuronas con somas redondeados o elípticos que tienen dos o tres dendritas. Las dendritas primarias suelen ser cortas, mientras que las ramas secundarias son más largas y se ramifican en sus extremos. Además, sus dendritas muestran la presencia de numerosas gémulas dendríticas. Estas células carecen de axón, por lo que se incluyen en la categoría de células amacrinas. En ocasiones se pueden integrar en las fibras del TOL (Larriva-Sahd, 2008).

En la parte más profunda de la capa granular están las células granulares internas, que presentan somas redondeados o triangulares y también carecen de axón (Hinds, 1968). Sus procesos dendríticos consisten en una dendrita ascendente gruesa y uno o dos conjuntos de ramas cortas y delgadas. Al igual que las granulares externas, presentan gémulas en sus dendritas ascendentes. Las células granulares internas se comunican con las dendritas de las células en penacho y células mitrales, pero también con los somas de ciertas células periglomerulares y neuronas superficiales de axón corto (Rall *et al*., 1966; Larriva-Sahd, 2008).

En un estrato más interno de la capa granular se ubican las células enanas y las neuronas poligonales. Las células enanas son interneuronas sin axón que cuentan con un soma esférico, muy pequeño y su árbol dendrítico está desprovisto de gémulas (Larriva-Sahd, 2008). Las neuronas poligonales son pequeñas neuronas fusiformes bipolares que cuentan con dendritas pareadas. Sus axones se resuelven creando ramificaciones que se extienden por el neurópilo, relacionándose con las células granulares externas y con las células enanas.

Asimismo, en el bulbo olfativo accesorio se pueden encontrar diferentes tipos de células gliales. Las células de la glía radial, como las células gliales envolventes olfativas, son las más comunes, pero también se observan astrocitos y oligodendrocitos (Martín-López *et al*., 2012). Respecto al circuito básico que sigue la información sensorial en el BOA, existen funcionalmente tres componentes neuronales principales que se activan de forma secuencial mediante la estimulación vomeronasal: los axones de las neuronas sensoriales vomeronasales, las células mitrales y las células granulares (Jia *et al*., 1999). Los axones de las neuronas sensitivas vomeronasales, presentes en el estrato apical del epitelio vomeronasal (V1R), se distribuyen en la zona anterior del BOA (Del Punta *et al*., 2000), mientras que, las neuronas sensitivas vomeronasales del estrato basal (V2R) proyectan sus axones a la mitad caudal del mismo (Herrada & Dulac, 1997). Por otra parte, aunque las células mitrales reciben información de varios glomérulos, se conectan únicamente con axones de neuronas sensitivas

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

vomeronasales del mismo tipo (V1R o V2R). De este modo, se produce una convergencia de entradas sensoriales específicas en una pequeña población de células mitrales. En el BOP, se produce un patrón de convergencia mucho más estricto, ya que la información que recibe cada célula mitral proviene de un solo glomérulo (Del Punta *et al*., 2002).

Morfológicamente, el BOA presenta diferencias significativas entre las múltiples especies de mamíferos. En aquellos grupos de animales en que esta estructura presenta un máximo desarrollo, se puede identificar una clara laminación, aunque tal como hemos comentado, esta, generalmente, no permite diferenciar las capas plexiforme externa, mitral y plexiforme interna, formando estas un amplio estrato (mitral plexiforme / celular externo), formado por células de proyección (mitrales / principales) distribuidas en el seno de un neurópilo. Por otro lado, las especies con un BOA menos sofisticado presentan un estrato mitral/plexiforme muy reducido en el que incluso resulta difícil poder discriminar las células de proyección. El caso del ornitorrinco (*Ornithorhynchus anatinus*) es único entre los mamíferos, ya que en esta especie el BOA y el BOP cuentan con el mismo tamaño. Asimismo, tanto el ornitorrinco como la equidna (*Tachyglossus aculeatus*), ambos monotremas, cuentan con seis capas bien diferenciadas conformando la estructura laminar del BOA (Ashwell, 2012).

Los roedores también poseen un BOA con un alto grado de desarrollo, sin embargo, tanto la rata (Segovia *et al*., 1984; Larriva-Sahd, 2008) como el ratón (Salazar *et al*., 2006; Yokosuka, 2012) muestran límites poco diferenciados entre las capas plexiforme externa, mitral y plexiforme interna. Aun así, ambos murinos cuentan con una capa mitral-plexiforme de amplio grosor, que contiene una densa red de células mitrales y empenachadas. En el caso de los lagomorfos, el BOA cuenta con un gran desarrollo, y concretamente, el conejo (*Oryctolagus cuniculus*), muestra una configuración laminar donde destaca una amplia capa mitral-plexiforme formada por tres tipos de células principales: células grandes, empenachadas y redondeadas (Villamayor *et al*., 2019). Entre las diferentes especies de quirópteros existe una gran variabilidad en el desarrollo de su BOA. De forma general presentan únicamente cuatro capas diferenciables, sin embargo, en algunos casos, como por ejemplo *Glossophaga soricina*, Frahm & Bhatnagar (1980) discriminaron la presencia de las capas plexiformes (interna y externa) y la capa de células mitrales. El resto de los órdenes de mamíferos estudiados presentan las capas plexiformes y la capa mitral fusionadas en una única capa mitral-plexiforme. Los marsupiales cuentan con un BOA sofisticado, en cambio, su laminación se restringe a cuatro capas. A pesar de ello, su capa mitral-plexiforme cuenta con un elevado grosor. Estas características han sido observadas en el colicorto gris (*Monodelphis domestica*) (Jia & Halpern, 2004) y en el ualabí de Tammar (*Notamacropus eugenii*) (Schneider *et al*., 2012).

Los carnívoros presentan de forma general un desarrollo sorprendentemente moderado de su BOA, siendo los más estudiados los domésticos. Existe en este caso diferencias notables entre los félidos y los cánidos. Aunque en ambos casos manifiestan cuatro estratos configurando su laminación, los primeros presentan un desarrollo mucho más apreciable de la capa mitral-plexiforme (Salazar & Sánchez-Quinteiro, 2011; Salazar *et al*., 2013), Sin embargo, en el zorro rojo (*Vulpes vulpes*) se ha observado un mayor grado de diferenciación del BOA que en el

USC

perro, presentando una gruesa capa glomerular. Asimismo, en esta última especie las líneas imaginarias que separan los diferentes estratos siguen trayectos irregulares, hasta el punto de que la capa mitral-plexiforme presenta notables prolongaciones que se adentran en la capa glomerular (Ortiz-Leal *et al*., 2022). Este hecho plantea la hipótesis de una posible involución del sistema vomeronasal como consecuencia de la presión de selección y del entrecruzamiento asociados a la domesticación de los perros. Finalmente, los artiodáctilos estudiados como la oveja (*Ovis orientalis aries*), el corzo siberiano (*Capreolus pygargus*) o el hipopótamo común (*Hippopotamus amphibius*), cuentan con un desarrollo moderado del BOA, siendo este similar al de los carnívoros, ya que también presentan cuatro capas formando su organización laminar (Salazar *et al*., 2003; Park *et al*., 2014; Kondoh *et al*., 2017a).

Respecto al estudio neuroquímico del BOA, el empleo de las proteínas Gαi2 y Gαo ha sido objeto de gran atención pues ambas proteínas son indicadores de la expresión de las familias de receptores vomeronasales V1R y V2R, respectivamente; estableciendo una zonación anteroposterior en las especies que presentan ambos receptores, y mostrando la organización del BOA en dos áreas: una región anterior rica en Gαi2, y otra región posterior rica en Gαo (Tirindelli, 2021). De este modo, el análisis de ambas proteínas G permite evaluar si la especie estudiada se encuentra dentro del modelo uniforme, o si por el contrario, muestra un patrón segregado. En el caso del marcador Gαi2, el marcaje se restringe a las capas nerviosa y glomerular del BOA, sin embargo, el marcador Gαo se expresa tanto en las capas nerviosa y glomerular, como en el resto de los estratos que conforman el BOA (Tirindelli *et al*., 1998).

Por otro lado, se han utilizado muy diversos marcadores inmunohistoquímicos en el estudio del BOA. Las proteínas ligantes de calcio calbindina (CB), calretinina (CR), parvalbúmina (PV), neurocalcina (NC), secretagoguina (Wagner *et al*., 2000) se expresan habitualmente en ciertas capas y poblaciones celulares, tanto en el BOA como en el BOP (Jia & Halpern, 2004; Alonso *et al*., 2001; Briñón *et al*., 2001). Asimismo, la CR marca las células mitrales y puede expresarse en glomérulos atípicos del BOP, situados de forma habitual en las inmediaciones del BOA (Weruaga *et al*., 2001). La proteína ácida fibrilar glial (GFAP), se emplea para identificar de forma general el componente glial del BOA, y de forma concreta los astrocitos y las células envolventes (Smithson & Kawaja, 2009). La proteína 2 asociada a microtúbulos (MAP2), se expresa principalmente en las dendritas de las células mitrales (Dehmelt & Halpain, 2005). De este modo, produce un marcaje intenso en las capas plexiforme externa y mitral, pero también se puede expresar en las capas plexiforme interna y granular. La proteína 43 asociada al crecimiento (GAP-43), también denominada proteína de la plasticidad, se expresa en los conos de crecimiento neuronal durante el desarrollo (Benowitz *et al*., 1990). En el BOA, produce un marcaje que se restringe a las capas nerviosa, glomerular y granular (Villamayor *et al*., 2020). La proteína marcadora olfativa (OMP) está involucrada en la transducción de señales, y se emplea para valorar el grado de madurez neuronal (Shapiro *et al*., 1997) del sistema olfativo. Este marcador se circunscribe a las capas nerviosa y glomerular en el BOA. Asimismo, se emplean varios marcadores en el BO para identificar poblaciones neuronales que expresan distintos tipos de receptores neuronales, tales como receptores GABA, receptores dopaminérgicos (Mugnaini *et al*., 1984), receptores colinérgicos (Le Jeune *et al*., 1995),

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

receptores adrenérgicos (Woo & Leon, 1995) y receptores serotoninérgicos (Huang *et al*., 2017). Por otro lado, también es habitual el estudio inmunohistoquímico de varios neuropéptidos en el BOA, como la sustancia P, la colecistoquinina o la neurotensina (Matsutani *et al*., 1988) y marcadores neuronales como la PGP9.5 (Lundberg *et al*., 1988) o la doblecortina (DCX) (Nacher *et al*., 2001).

Otra técnica habitualmente empleada en la caracterización del BOA es el marcaje histoquímico con lectinas. El patrón de marcaje que produce cada lectina puede variar entre las diferentes especies estudiadas, aunque las lectinas *Ulex europaeus* agglutinin (UEA), *Bandeiraea simplicifolia* isolectin B_4 (BSI-B_4) y *Lycopersicon esculentum* agglutinin (LEA) se expresan en las capas nerviosa y glomerular de forma habitual. Concretamente, la UEA permite diferenciar la zonación anteroposterior del BOA en especies del modelo segregado, al expresarse con mayor intensidad en la región anterior (VR1) (Salazar & Sánchez-Quinteiro, 2003). Por el contrario, la lectina *Vicia villosa* agglutinin (VVA) produce un marcaje más intenso en la parte posterior del BOA (Takami *et al*., 1992b). De este modo, se pueden identificar diferentes poblaciones neuronales. Asimismo, se emplean otras muchas lectinas en el estudio del BOA, tales como la lectina de la soja (SBA), la lectina del germen de trigo (WGA) o la lectina *Dolichos Biflorus* agglutinin (DBA) (Shapiro *et al*., 1995; Taniguchi *et al*., 1993).

Respecto al flujo de información vomeronasal, las neuronas sensitivas vomeronasales envían la información sensorial recibida desde el epitelio receptor (ER) vomeronasal hasta las células mitrales del BOA (Hovis *et al*., 2012). En contraste, la información olfativa es captada en el epitelio olfativo principal, y posteriormente viaja por los nervios olfativos hasta el BOP. A continuación, dichos estímulos se transmiten a través de varias proyecciones hasta diferentes áreas cerebrales.

La aplicación de los estudios de trazadores neuronales a las vías olfativas permitió discriminar la existencia de proyecciones segregadas y paralelas de los bulbos olfativos principal y accesorio (Raisman, 1972; Scalia & Winans, 1975). Es lo que se conoció como la hipótesis de un sistema olfativo dual, formulación demostrada por vez primera mediante el uso de la técnica de Fink-Heimer en el conejo (Winans & Scalia, 1970). Aunque esta hipótesis sigue siendo actualmente válida, ha sido refinada a lo largo de las últimas décadas, muy especialmente en lo que se refiere al estudio de las proyecciones secundarias y terciarias demostrándose la existencia de una comunicación neuronal entre ambas vías.

Las eferencias del BOP se proyectan de forma ipsilateral hacia el núcleo olfativo anterior, la tenia tecta, el tubérculo olfativo, la corteza piriforme, las áreas lateral y medial de la corteza entorrinal y los núcleos amigdaloideos laterales (Shipley & Adamek, 1984; Dulac & Wagner, 2006). Entre las proyecciones terciarias de la vía destaca la comunicación de la corteza entorrinal con el hipocampo y la corteza piriforme y amígdala lateral con el hipotálamo y el núcleo talámico mediodorsal (Price, 1985; Courtiol & Wilson, 2015). Recientemente se ha demostrado la existencia de una proyección directa de la información sensorial olfativa a la subdivisión anterior de la amígdala medial, estructura tradicionalmente implicada en la

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

mediación de la información feromonal, lo cual apoya la hipótesis de que ambos sistemas olfativos actúan de forma colaborativa y no diferencial en el control de los comportamientos socio-sexuales y anti-depredadores (Cádiz-Moretti *et al*., 2016).

A diferencia del sistema olfativo principal, las proyecciones eferentes del BOA pasan por alto el eje talamocortical distribuyéndose de forma ipsilateral a núcleos del sistema límbico de tercer orden, como es el caso del núcleo del tracto olfativo accesorio, el núcleo de la estría terminal y los núcleos amigdaloides corticales medial y posteromedial, que conjuntamente forman la amígdala vomeronasal (Scalia & Winnans, 1975; Devor, 1976; Martinez-Marcos, 2009; Gutiérrez-Castellanos *et al*., 2014; Stowers & Liberles, 2016). La amígdala medial está fuertemente interconectada con otras estructuras que reciben información vomeronasal desde el BOA. Esto sugiere que la información detectada por el sistema vomeronasal se somete a un procesamiento intrínseco complejo antes de ser transmitida a otras estructuras (Pardo-Bellver *et al*., 2012). El centro final de procesamiento entre la información vomeronasal y los efectores es el hipotálamo (Lo & Anderson, 2011). De este modo, el SVN está implicado directamente en la actividad de hormonas sexuales y puede facilitar el desarrollo de comportamientos agresivos, defensivos o reproductivos (Trotier, 2011). Es importante señalar que las proyecciones olfativas y vomeronasales presentan cierto grado de superposición en la corteza amigdaloidea y la amígdala medial lo que sugiere que hay rutas anatómicas que permiten una amplia integración de la información olfatoria y vomeronasal (Pro-Sistiaga *et al*., 2007; Pardo-Bellver *et al*., 2012; Cádiz-Moretti *et al*., 2013).

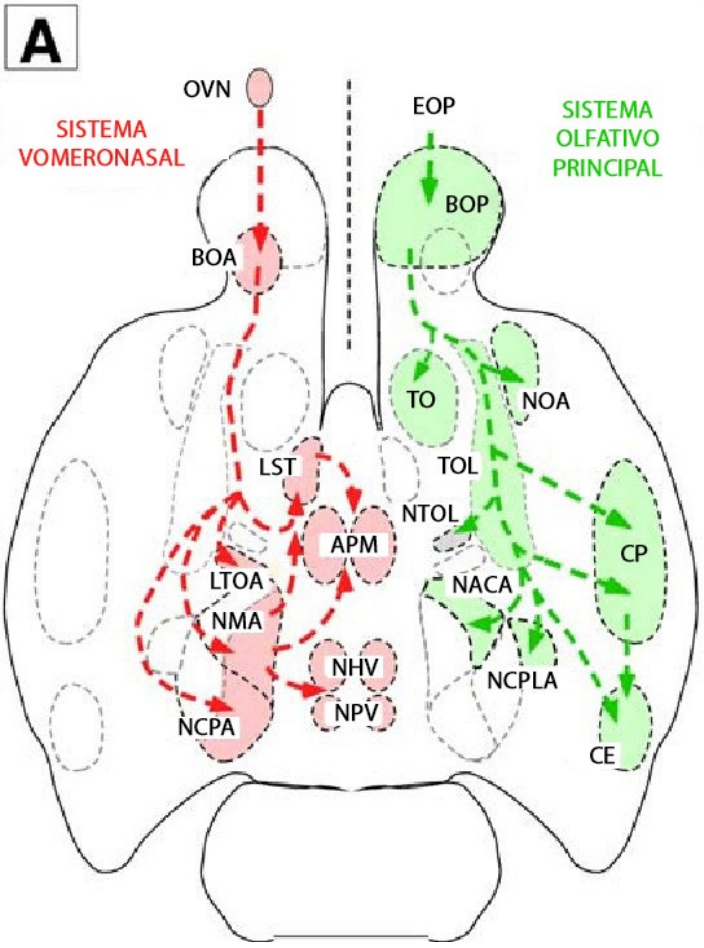

Ilustración 4. Comparativa del flujo de información entre el sistema vomeronasal y el sistema olfativo principal. Abreviaturas: (APM) Área Preóptica Medial; (BOA) Bulbo Olfativo Accesorio; (BOP) Bulbo Olfativo Principal; (CE) Corteza Entorrinal; (CP) Corteza Piriforme; (EOP) Epitelio Olfativo Principal; (LST) Núcleo del Lecho de la Estría Terminal; (LTOA) Núcleo del Lecho del Tracto Olfativo Accesorio; (NACA) Núcleo Amigdalino Cortical Anterior; (NCPA) Núcleo Cortical Posteromedial de la Amígdala; (NCPLA) Núcleo Cortical Posterolateral de la Amígdala; (NHV) Núcleo Hipotalámico Ventromedial; (NMA) Núcleo Medial de la Amígdala; (NOA) Núcleo Olfativo Anterior; (NPV) Núcleo Premamilar Ventral; (NTOL) Núcleo del Tracto Olfativo Lateral; (OVN) Órgano Vomeronasal; (TO) Tracto Olfativo; (TOL) Tracto Olfativo Lateral. Fte: Yokosuka (2012) Exp Anim. 61(1): 14.

USC
UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

Asimismo, el BOP y el BOA se diferencian por sus conexiones aferentes centrífugas (Mohrhardt *et al*., 2018). El BOP recibe masivas proyecciones colinérgicas y GABAérgicas del encéfalo basal que se originan principalmente en el núcleo de la rama horizontal de la banda diagonal de Broca y en el núcleo preóptico magnocelular (Záborszky *et al*., 1986). La señalización colinérgica dentro del BO modula el aprendizaje olfatorio y la memoria, la discriminación de olores, la habituación al olor y las interacciones sociales (De Saint Jan *et al*., 2022). Desde una perspectiva de la neuroanatomía comparada, el estudio de Liberia *et al*. (2015) indica que la conectividad sináptica de los circuitos colinérgicos aferentes está altamente conservada en el BO de mamíferos macrosmáticos y microsmáticos. En cuanto a las aferencias GABAérgicas del encéfalo basal, éstas inervan todas las capas del BOP al menos tan densamente como los axones colinérgicos, pero solo unos pocos estudios han examinado su función en el procesamiento del olor (Böhm *et al*., 2020).

El BOA recibe importantes aferencias de un amplio rango de centros nerviosos. El núcleo lecho de la estría terminal y la amígdala vomeronasal proyectan recíprocamente al BOA, formando así un circuito de retroalimentación (Gomez & Newman, 1992). Los estudios de trazadores han revelado que ambas proyecciones de retroalimentación al BOA están organizadas topográficamente y utilizan diferentes neurotransmisores (Fan & Luo, 2009). Específicamente, las proyecciones GABAérgicas del núcleo lecho terminan en la capa celular externa, mientras que las proyecciones glutamatérgicas de la amígdala se dirigen a la capa interna de células granulares. Un número significativo de estas neuronas de retroalimentación en ambas áreas expresan receptores de estrógeno ER-α, vinculando el estado endocrino del animal con la integración en el BOA (Fan & Luo, 2009). La relevancia de esta vía fue posteriormente confirmada desde distintas aproximaciones morfofuncionales (Inbar *et al*., 2022; Pardo-Bellver *et al*., 2022).

Otras aferencias importantes para la función del BOA provienen de estructuras noradrenérgicas del tronco del encéfalo que juegan un papel crucial en la formación de una memoria olfativa (Keverne & Brennan, 1996). Esta interviene, por ejemplo, durante el apareamiento, en el cual la estimulación de la zona vagino-cervical da lugar a incrementos sostenidos en los niveles de noradrenalina en el BOA, los cuales persisten alrededor de 4 horas (Brennan *et al*., 1995). Este lapso temporal establece una fase crucial en la que la noradrenalina genera modificaciones plásticas en la intensidad de las conexiones sinápticas dendrodendríticas (Brennan & Keverne, 2004). Adicionalmente, la banda diagonal de Broca es el origen de numerosas fibras colinérgicas implicadas en un aumento de la excitabilidad de las células granulares (Takahashi & Kaba, 2010), mientras que desde el rafe se envían abundantes fibras serotoninérgicas a ambos bulbos olfativos que actúan de forma similar a las colinérgicas (Huang *et al*., 2017).

En resumen, anatómicamente tanto el sistema olfativo como el SVN presentan una red de conexiones propia, que concretamente, en el BOA se asocia estrechamente con áreas como la amígdala y el núcleo hipotalámico ventromedial (Raisman, 1972, Mohrhardt *et al*., 2018).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.3 ASPECTOS ESPECÍFICOS

Para seleccionar las especies que hemos empleado en nuestra investigación sobre el SVN, se han tenido en cuenta principalmente dos objetivos: representar órdenes de mamíferos lo más diversos posible y utilizar especies salvajes poco estudiadas, o en las que directamente no haya información morfofuncional sobre su SVN. De este modo, pretendemos contextualizar el SVN entre los diferentes mamíferos ofreciendo una visión general, que atienda a la gran diversidad de especies. Asimismo, resulta interesante aportar información neuroanatómica de especies que no han sido objeto de estudio, debido a que el SVN presenta una gran variabilidad interespecífica, observándose en cada especie particularidades y características únicas. El estudio de estas particularidades se ha empleado como método de clasificación filogenético tanto a nivel neuroanatómico (Wöhrmann-Repenning, 1984b) como genético (Grus & Zhang, 2009), pero también resulta imprescindible a la hora de entender el funcionamiento, la evolución y la implicación del SVN en los mamíferos de una forma íntegra.

Las especies elegidas han sido el capibara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), un roedor histricomorfo; el ualabí de Bennet (*Notamacropus rufogriseus*), un diprotodonto macrópodo; la suricata (*Suricata suricatta*), un carnívoro herpéstido y la gacela dama (*Nanger dama*), un artiodáctilo de la familia de los bóvidos.

En el caso del capibara, disponer de tres ejemplares recién nacidos nos permitió evaluar cuestiones específicas tales como el grado de desarrollo del SVN en etapas tan tempranas, o su grado de madurez y funcionamiento perinatal en estos roedores. Adicionalmente, esta especie presenta un interés añadido, ya que la mayoría de los roedores que se han empleado en el estudio del SVN son murinos domesticados como la rata de laboratorio (*Rattus norvegicus domestica*). Estas especies pueden presentar diferencias significativas con los roedores salvajes debido al proceso de domesticación, como sucede en cánidos, donde la presión de la selección artificial ejercida sobre los perros domésticos presuntamente juega un papel clave en la involución de su SVN (Ortiz-Leal *et al*., 2022). De este modo, el análisis del capibara nos permite comparar y contrastar el modelo de SVN de los murinos domesticados, que ha sido empleado como modelo general de SVN en los roedores. Por último, resulta importante señalar que el capibara es un mamífero semiacuático, y que su estudio permite ampliar la escasa información neuroanatómica sobre el SVN en dichas especies. Esta caracterización es fundamental, ya que los hábitos semiacuáticos podrían influir en la organización y funcionamiento de los sistemas quimiosensoriales (Catania, 2006).

Respecto al estudio del ualabí de Bennett, hemos elegido esta especie porque cumple con los objetivos generales, pero también porque consta de un interés especial adicional a los ya comentados. Esto es debido a que recientemente, y mediante una investigación en el ualabí de Tammar (Schneider *et al*., 2012), se propuso un nuevo modelo de SVN atendiendo a la presencia de las dos familias de receptores vomeronasales: V1R y V2R. En dicha investigación, se concluye que el ualabí de Tammar únicamente expresa receptores V2R, y por ello, no encaja en ninguno de los dos modelos existentes: el modelo uniforme (especies que expresan receptores V1R) y el modelo segregado (especies que expresan ambos receptores V1R y V2R).

USC
DE SANTIAGO

Por esta razón, el estudio del ualabí de Bennet resulta de interés, ya que los mismos autores de la investigación comentada expresan la necesidad de corroborar sus resultados debido a la magnitud de los hallazgos.

La suricata fue otro de los animales elegidos debido a que cumple los requisitos generales, pero además presenta una serie de características que suponen un interés adicional. En primer lugar, no existe información neuroanatómica sobre el SVN de esta especie, ni dentro de la familia Herpestidae a la que pertenece. Por otro lado, estos animales constan de un sistema gregario en el que existe una dominancia marcada, ya que solo son un macho y una hembra los que monopolizan la reproducción en grupos de hasta cuarenta individuos (O'Riain *et al*., 2000). Asimismo, parte de su vida transcurre en tobos oscuros que ellos mismos excavan. En este contexto, el SVN puede jugar un papel decisivo, por lo que resulta de interés su estudio y comparación con el sistema olfativo, en un animal en el que no existe información morfofuncional al respecto. Por otro lado, en el pasado la suricata se ubicó ambiguamente en el grupo de los cánidos o de los félidos, aunque actualmente es considerada feliforme. Esto se puede complementar con el estudio de su SVN, utilizando la comparativa neuroanatómica de dicho sistema con el de los cánidos y los félidos, como herramienta de clasificación filogenética.

Por último, la gacela dama también cumple los objetivos generales a la vez que se trata de un bóvido salvaje en el que no se ha investigado el SVN. Pero también presenta un interés adicional, ya que actualmente es considerada una especie en peligro de extinción. En virtud de la importante implicación que tiene el SVN en la reproducción, consideramos que su caracterización en esta especie tiene un interés relevante. En ciertas especies con un SVN bien caracterizado, ya se emplean métodos relacionados con este sistema para mejorar la reproducción, como el uso de feromonas, que permite controlar el nivel de estrés y mejora la reproductibilidad (Tiwari *et al*., 2014). Y si bien estos métodos podrían ser de utilidad en centros de recuperación para mejorar la situación de la gacela dama, resulta imprescindible el estudio de su SVN como punto de partida para su futura implementación.

1.3.1 Capibara (*Hydrochoerus hydrochaeris*)

Al realizar el estudio en profundidad de las características morfológicas macroscópicas y microscópicas del SVN en el capibara recién nacido, nos centramos en lograr dos objetivos principales.

En primer lugar, obtener información general sobre este sistema en un modelo de roedor silvestre, es decir, que no ha sido sometido a un proceso de selección genética. El interés de este análisis comparativo se fundamenta en que la mayoría de los estudios acerca del SVN se han realizado en cepas de roedores de laboratorio, expuestas a una presión de selección artificial que no refleja la presión de selección presente en la naturaleza. Por lo tanto, estas cepas de laboratorio presentan diferencias tanto a nivel genético como comportamental significativas en comparación con los modelos de roedores silvestres (Smith *et al*., 1994).

USC DE COMPOSTELA

Por otro lado, en relación con el grado de desarrollo y autonomía que presentan las diferentes especies en el momento del nacimiento, se distinguen especies altriciales, con un grado de desarrollo menor, y precociales, con un mayor nivel de autonomía en la etapa postnatal temprana. Tanto los ratones como las ratas presentan un carácter altricial, sin embargo, los roedores histricomorfos como el capibara, muestran una naturaleza precocial. Los recién nacidos altriciales carecen de sentidos completamente desarrollados y requieren cuidados parentales extensos, como crianza o aprovisionamiento de alimentos. Por el contrario, las especies precoces nacen con sentidos más desarrollados, requieren cuidados parentales limitados y pueden alimentarse de manera autosuficiente desde el principio, mientras aún son amamantados (Scheiber *et al*., 2017). Estas diferencias en la maduración de los sistemas sensoriales entre las especies altriciales y precociales pueden proporcionar información sobre los patrones de desarrollo del comportamiento en ambos grupos. Dentro de los roedores, el desarrollo del SVN se ha evaluado exclusivamente en especies altriciales inmaduras, incluidos el ratón y la rata (Salazar *et al*., 2003), por ende, ningún estudio ha examinado la madurez morfológica y funcional del SVN en roedores precoces durante el período perinatal. En este contexto, decidimos determinar el grado en que la morfología del SVN del capibara se ha desarrollado en el primer día de vida.

Asimismo, los histricomorfos conforman un modelo que exhibe una gran diversidad anatómica, como demuestran los estudios realizados en chinchillas, cobayas o degús (Oikawa *et al*., 1994; Sugai *et al*., 1997; Suárez & Mpodozis, 2009). En el caso del capibara, únicamente se ha descrito la morfología y organización del BOA en individuos adultos en un estudio que prueba la existencia de una zonación anteroposterior, determinada por la expresión de las proteínas G. Igualmente, atendiendo al carácter semiacuático de esta especie, se sugiere que las especializaciones ecológicas pueden desempeñar un papel importante en la configuración de la BOA.

De este modo, en nuestra investigación pretendemos hacer un estudio descriptivo de las características anatómicas, histológicas, histoquímicas e inmunohistoquímicas que presenta el SVN del capibara recién nacido, tanto a nivel del OVN como del BOA, y analizar su estado funcional en dicha etapa. De esta manera podremos contribuir, por una parte, a solventar las lagunas existentes en lo concerniente a la comprensión del desarrollo vomeronasal de los roedores, y por otra, a caracterizar las peculiaridades del SVN en un roedor salvaje con el fin de valorar si el modelo de SVN de los múridos de laboratorio se puede considerar un modelo general entre los roedores.

Con este fin, se emplearon técnicas de disección y microdisección para la extracción de los órganos vomeronasales y el encéfalo completo, así como para diseccionar la trayectoria de los nervios vomeronasales que conectan ambas estructuras. Asimismo, la descalcificación nos permitió estudiar las relaciones topográficas del SVN. Las tinciones histológicas y la microscopía confocal nos permitieron obtener una visión general de la organización y estructura de sus componentes, y posteriormente, mediante el análisis histoquímico e

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

inmunohistoquímico, basado en el uso de un amplio panel de lectinas y anticuerpos, obtuvimos información morfofuncional acerca de muy diversos aspectos.

Las lectinas estudiadas fueron la aglutinina de tojo, *Ulex europaeus* (UEA), la isolectina B_4 de griffonia, *Bandeiraea simplicifolia* (BSI-B_4) y la aglutinina de tomate, *Lycopersicon esculentum* (LEA), que son marcadores del SVN y/o del sistema olfativo principal en varias especies de mamíferos. Por otro lado, el estudio inmunohistoquímico abarcó un gran número de anticuerpos, con los objetivos principales de proporcionar información útil sobre la función y madurez del SVN, e identificar los receptores vomeronasales que se expresan. Se estudiaron las proteínas Gαi2 y Gαo, la proteína 2 asociada a microtúbulos (MAP-2), la proteína 43 asociada al crecimiento axonal (GAP-43), la hormona liberadora de hormona anti-luteinizante (LHRH), la proteína marcadora olfativa (OMP), la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y las proteínas ligantes de calcio calbindina (CB) y calretinina (CR).

1.3.2 Ualabí de Bennett (*Notamacropus rufogriseus*)

Con el interés de representar diversos órdenes de mamíferos y de investigar especies salvajes poco estudiadas, hemos decidido realizar un profuso estudio morfofuncional en el SVN de un pequeño marsupial macrópodo, el ualabí de Bennett (*Notamacropus rufogriseus*).

Asimismo, esta especie muestra un elevado interés adicional debido a que un estudio reciente realizado en una especie del mismo género, el ualabí de Tammar (*Notamacropus eugenii*), ha planteado que estos animales solo expresan receptores V2R en el BOA (Schneider *et al*., 2012). Hasta ahora, se habían descrito dos modelos de SVN atendiendo a la expresión de las proteínas Gαi2 y Gαo, ya que ambas están ligadas a los receptores V1R y V2R respectivamente. De este modo, existen especies que expresan ambos receptores, tanto V1R como V2R (modelo segregado), y especies que únicamente conservan los receptores V1R (modelo uniforme). Sin embargo, el estudio de Schneider planteó que el ualabí de Tammar pudiese presentar un nuevo modelo de SVN, intermedio a los tipos segregado y uniforme ya descritos. Actualmente, el deterioro de la vía V2R en especies del modelo uniforme supone un desafío para comprender el papel que juega el SVN en los mamíferos, con lo que la aparición del tercer modelo propuesto enreda aún más este complejo panorama. Asimismo, desde la publicación de dicho estudio, no han aparecido contribuciones a la literatura científica que puedan apoyar o refutar la existencia de este nuevo modelo, por lo que éste sigue siendo una cuestión abierta.

Con el objetivo de examinar la existencia potencial de este tercer modelo, realizamos un estudio morfológico e inmunohistoquímico en el SVN del ualabí de Bennett, centrándonos en la expresión de las subunidades Gα tanto en el OVN como en el BOA. Por otro lado, con la finalidad de caracterizar morfofuncionalmente su SVN, realizamos una investigación anatómica, histológica, histoquímica e inmunohistoquímica integral, pues los estudios previos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

en macrópodos habían dedicado escasa atención a la neuroquímica del OVN (Schneider *et al*., 2008) y del BOA (Schneider *et al*., 2012).

Se han empleado técnicas de disección y microdisección para la extracción de las principales estructuras vomeronasales (OVN, nervios vomeronasales y BOA) y técnicas de descalcificación para su estudio topográfico. Asimismo, se utilizaron tanto tinciones para el estudio histológico general (hematoxilina-eosina, azul alcián y PAS) y específico (tricrómico de Gallego, tolivia y Nissl), como microscopía confocal para identificar las fibras elásticas del OVN a través de la autofluorescencia. Respecto al estudio histoquímico, se estudiaron las lectinas aglutinina de *Ulex europaeus* (UEA) y aglutinina de *Lycopersicon esculentum* (LEA). Por último, la caracterización inmunohistoquímica se llevó a cabo mediante el uso de una panoplia de anticuerpos, con el objetivo de analizar diversos aspectos específicos. Las células mitrales se marcaron con la proteína 2 asociada a los microtúbulos (MAP-2). El análisis astrocítico y la identificación de células envolventes se realizaron a través de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP). La madurez neuronal se evaluó con la proteína marcadora olfativa (OMP). Para estudiar el crecimiento neuronal se usó la proteína 43 asociada al crecimiento (GAP43), y finalmente, las proteínas ligantes de calcio calbindina y calretinina se emplearon para determinar subpoblaciones neuronales específicas.

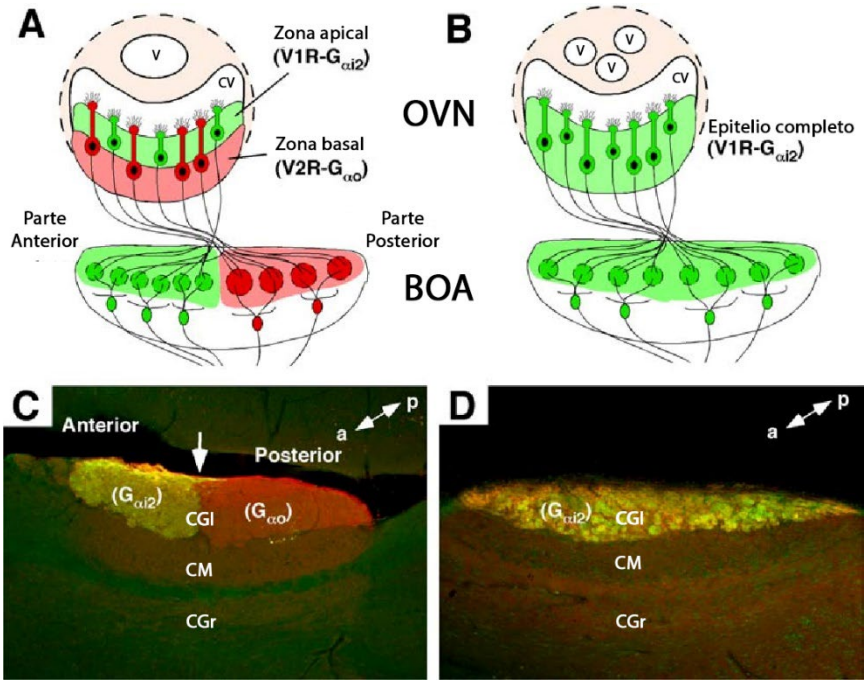

Ilustración 5. Modelos de SVN atendiendo a la expresión de proteínas G. Distribución de los diferentes receptores vomeronasales y sus patrones de proyección en el Bulbo Olfativo Accesorio. (A) Modelo segregado; (B) Modelo Uniforme. (C) Sección sagital del bulbo olfativo accesorio del ratón. Mediante el marcaje inmunohistoquímico se tiñe de amarillo la parte anterior Gαi2 positiva y de rojo la parte posterior Gαo positiva. (D) Sección sagital del bulbo olfativo accesorio del gato. Mediante el marcaje inmunohistoquímico se tiñe de amarillo todo el bulbo olfativo accesorio. Abreviaturas: (BOA) Bulbo Olfativo Accesorio; (CGl) Capa Glomerular: (CGr) Capa Granular; (CM) Capa Mitral; (OVN) Órgano Vomeronasal. Fte: Yokosuka (2012) Exp Anim. 61(1): 16.

1.3.3 Suricata (*Suricata suricatta*)

La investigación de los bulbos olfativos tanto principales (BOP) como accesorios (BOA) en la suricata (*Suricata suricatta*), permite representar otro orden de mamíferos, los carnívoros, mediante el estudio de una especie salvaje que presenta un estrecho vínculo con los estímulos

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

químicos, y de la cual no existe información morfofuncional al respecto. Asimismo, la suricata es una especie con una compleja organización social y habita en grandes redes subterráneas, lo que probablemente se traduzca en un elevado desarrollo de sus sentidos de percepción química. De hecho, se ha determinado que estos animales son capaces de reconocer el parentesco mediante el aroma propio de cada individuo (Leclaire *et al*., 2013).

Adicionalmente, el estudio del SVN en la suricata presenta un interés añadido, ya que puede emplearse como criterio de clasificación filogenético atendiendo a las similitudes y diferencias que presenta en comparación con el de otras especies. Esto resulta conveniente porque en el pasado, la suricata representó un conflicto al ubicarse de forma indeterminada tanto en el grupo de los cánidos como en el de los félidos. Actualmente, se considera feliforme y se ubica dentro de la familia herpestidae, en la que no existen referencias de estudios morfofuncionales sobre el SVN. De este modo, su estudio permite aportar valiosa información filogenética que contraste los análisis previos, y permite obtener una representación morfológica y funcional de los sistemas vomeronasal y olfativo en una especie modelo dentro de la familia de los herpéstidos.

En esta ocasión, realizamos un estudio comparativo entre los bulbos principales y accesorios para evaluar el grado de relación e interacción que existe entre los sistemas vomeronasal y olfativo en esta especie.

De este modo, orientados a llenar importantes vacíos en el conocimiento sobre las bases neuroanatómicas del procesamiento de las señales tanto feromonales como olfativas en la suricata, realizamos un detallado estudio histológico, histoquímico e inmunohistoquímico de ambos bulbos olfativos, principal (BOP) y accesorio (BOA). En un inicio, se extrajo el encéfalo completo mediante disección para evaluar el grado de desarrollo anatómico y la topografía de las áreas implicadas en la comunicación química. Asimismo, se diseccionó la cavidad nasal y se le practicó un corte transversal con el objetivo de identificar las relaciones topográficas y ubicar los OVN. Posteriormente, se emplearon tinciones generales (hematoxilina-eosina) y específicas (Nissl) para determinar las características estructurales propias de ambos bulbos olfativos. Esto también permitió emplear la contratinción con marcadores inmunohistoquímicos, que facilita la identificación de particularidades específicas y permite una visión histológica más completa. A continuación, se realizó el estudio histoquímico a través de tres lectinas relacionadas con los sistemas olfativo y vomeronasal, la aglutinina de *Ulex europaeus* (UEA), la isolectina B_4 de *Bandeiraea simplicifolia* (BSI-B_4) y la aglutinina de *Lycopersicon esculentum* (LEA). El análisis inmunohistoquímico abarcó un amplio número de anticuerpos, que proporcionan información sobre las propiedades morfofuncionales de ambos sistemas, olfativo y vomeronasal. Los anticuerpos contra Gαi2 y Gαo nos permitieron determinar qué familias de receptores feromonales (V1R o V2R, respectivamente) se expresan en el SVN. Las células mitrales, elementos neurales primarios del BOA, se marcaron con anticuerpos frente a la proteína 2 asociada a microtúbulos (MAP-2) y contra SMI-32, marcador de proteínas de neurofilamentos expresadas en las células mitrales de algunos mamíferos. El desarrollo neuronal se analizó mediante la proteína 43 asociada al crecimiento (GAP-43). La

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

madurez del sistema se determinó empleando la proteína marcadora olfativa (OMP). Las proteínas de unión al calcio calbindina (CB) y calretinina (CR) se utilizaron para identificar las subpoblaciones neuronales y los astrocitos y las células envolventes fueron marcados con la proteína ácida fibrilar glial (GFAP).

1.3.4 Gacela dama (*Nanger dama*)

Finalmente, hemos seleccionado la gacela dama (*Nanger dama*) para el análisis del SVN debido a que representa un orden diferente a los ya estudiados. En este caso se trata de un artiodáctilo salvaje, concretamente de la familia de los bóvidos, subfamilia Antilopinae, del que no se dispone de información morfofuncional acerca de su SVN.

El reflejo de "flehmen" en rumiantes salvajes es pronunciado y habitual, y se relaciona con la detección de feromonas que permiten principalmente la identificación del estado reproductivo (Hart, 1983, 2023), lo que implica que en estos animales el funcionamiento y desarrollo del SVN es fundamental. En este marco, resulta interesante evaluar el SVN de la gacela dama, y ampliar la escasa información al respecto en los bóvidos salvajes, con el objetivo de poder comparar sus características con las que presentan los bóvidos domésticos, como la vaca, la cual sí ha sido objeto de estudio (Salazar *et al*., 1997b).

Asimismo, la gacela dama presenta un interés adicional, ya que actualmente está catalogada como especie en peligro de extinción. Por ello, en virtud de la importante implicación que tiene el SVN en la reproducción, consideramos que la caracterización de dicho sistema en esta especie consolida el primer paso de cara a implementar potenciales aplicaciones basadas en la comunicación feromonal, que ayuden a revertir esta situación facilitando la reproductibilidad y el manejo en los centros de recuperación. De hecho, ya se emplean feromonas para mejorar los parámetros reproductivos en granjas o para reducir los niveles de estrés en animales domésticos. Sin embargo, las especies en las que se utilizan estas aplicaciones constan de un SVN bien caracterizado, tanto a nivel morfológico como funcional.

Macroscópicamente, se diseccionaron las principales estructuras del SVN, lo que permitió analizar la topografía relacionada. Una vez procesadas las muestras, se emplearon varias tinciones generales para resaltar los componentes estructurales. Posteriormente, con el interés de extraer la máxima información del SVN de la gacela dama, hemos realizado un análisis histoquímico e inmunohistoquímico tanto a nivel de OVN como en el BOA. Por ello, además de emplear los marcadores habituales hemos seleccionado una batería de marcadores adicional. Respecto al estudio histoquímico, se realizaron marcajes frente a las aglutininas de *Ulex europaeus* (UEA) y *Lycopersicon esculentum* (LEA). Asimismo, en esta ocasión se empleó el estudio de las lectinas *Vicia villosa* (VVA), *Soybean agglutinin* (SBA) y *Solanum tuberosum* (STL). Mediante el estudio inmunohistoquímico se investigaron diversos aspectos característicos del SVN de la gacela dama. Se determinó la presencia de las familias de receptores vomeronasales V1R y V2R empleando anticuerpos contra Gαi2 y Gαo,

USC DE COMPOSTELA

respectivamente. En este caso, se añadieron otras dos proteínas ligantes de calcio en el estudio. De este modo, la calbindina (CB) y la calretinina (CR) se complementaron con el análisis de la parvalbúmina (PV) y la secretagoguina (SG). El marcaje de las células mitrales se realizó con anticuerpos frente a la proteína 2 asociada a microtúbulos (MAP-2). El marcador GAP-43 se utilizó para evaluar el crecimiento neuronal. Las células envolventes y los astrocitos en el BOA se identificaron con la proteína ácida fibrilar glial (GFAP). La madurez neuronal del SVN se determinó con el marcador OMP. Por último, se analizaron dos marcadores adicionales que podrían aportar información valiosa, la citoqueratina-7 y el PGP 9.5.

A continuación, con el fin de sintetizar esta amplia introducción sobre el SVN, nos centraremos en las dos ideas principales. Por un lado, el SVN muestra una asombrosa diversidad morfológica y funcional a lo largo de todos los órdenes de mamíferos, sin embargo, la mayor parte de la información disponible a nivel anatómico, funcional e incluso genómico corresponde a los roedores de laboratorio. En consecuencia, resulta indispensable extender la información actual a otras especies para evitar los riesgos de la extrapolación, y a su vez, profundizar en las características específicas de cada grupo de animales con el fin de poder determinar una base con fundamento sobre el papel que desempeña el SVN en estas especies. Por otra parte, el estudio del SVN en una determinada especie facilita que esta se pueda beneficiar de aplicaciones mediante feromonas con el fin de mejorar los parámetros reproductivos y el bienestar animal. Algo que resultaría especialmente útil en centros de recuperación, de cara a la conservación de especies con una población mermada o en peligro de extinción. Con este propósito, hemos intentado incluir en nuestras investigaciones una representación del mayor número de órdenes de mamíferos posible, abordando cada especie con la máxima profundidad.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2 OBJETIVOS

En el Departamento de Anatomía de la Facultad de Veterinaria de Lugo, se ha realizado una densa labor investigadora sobre las bases neuroanatómicas de la comunicación mediada por feromonas. Desde la década de los noventa, sus investigadores han conseguido identificar y caracterizar el OVN y el BOA de múltiples especies, lo que permitió arrojar luz en un campo del que aún queda mucho por entender y descubrir. Por este motivo, hemos decidido aprovechar los valiosos recursos y conocimientos generados para dar continuidad al análisis morfofuncional del SVN en los mamíferos salvajes.

En el conjunto de los mamíferos los componentes primarios del sistema vomeronasal -OVN y BOA- se han descrito a fondo únicamente en ciertas especies, en su mayoría domésticas, siendo más allá de ellas, el ratón y la rata de laboratorio los más examinados. Adicionalmente, el SVN comprende un amplio rango de variabilidad en sus características, funciones y grado de desarrollo entre los seres vivos. Por lo tanto, resulta imprescindible ampliar el abanico de especies investigadas, con el fin de comprender de un modo integral los mecanismos que configuran el SVN de los mamíferos. Asimismo, para conseguir desarrollar y aplicar de forma fiable potenciales usos de las feromonas en una determinada especie, tales como la mejora de los parámetros reproductivos o la reducción de los niveles de estrés, es fundamental apoyarse en la caracterización de su SVN.

En virtud de lo comentado, definimos seis objetivos principales para realizar nuestras investigaciones.

1) En primer lugar, analizar el SVN de especies de las que hasta nuestro conocimiento, no existía información previa. Determinar las características específicas de su SVN nos permite contrastar, complementar y aumentar el conocimiento actual sobre dicho sistema, pero también facilitará la futura implementación en dicha especie de aplicaciones beneficiosas basadas en feromonas. Asimismo, los sujetos seleccionados deben representar diferentes órdenes de mamíferos con la finalidad de obtener, al menos, un modelo de referencia que proporcione mayor amplitud al concepto actual de SVN. Es importante tener en cuenta que la extensa variabilidad que presenta este sistema puede ser más acusada en individuos filogenéticamente más alejados.

2) Por otro lado, resulta de interés contrastar estudios controvertidos en especies ya investigadas, especialmente si suponen una contradicción, un conflicto o un cambio relevante

USC DE COMPOSTELA

en la forma de comprender el SVN de los mamíferos. Las diferentes técnicas y medios de los que dispone cada grupo investigador pueden influir de forma significativa en los resultados obtenidos, por ello, en estos casos puede ser recomendable realizar una revisión.

3) El siguiente objetivo es aportar información sobre el SVN de animales silvestres. Como ya hemos mencionado, la mayor parte de especies en las que se ha caracterizado este sistema han sido sometidas a una presión de selección genética debido a la domesticación. Por tanto, obtener varios modelos de SVN en especies salvajes nos permite comparar y valorar la influencia que ha podido tener la acción humana en este sistema.

4) Con el interés de examinar el grado de madurez, funcionamiento y desarrollo perinatal del SVN, hemos decidido analizar, en aquellos casos que ha sido posible, individuos en fase neonatal. De este modo, atendiendo a la cronología del sistema, podemos identificar su grado de implicación en cada etapa del desarrollo y establecer una comparativa con el SVN propio de la edad adulta.

5) Otra cuestión que tuvimos en cuenta fue el hacer extensivo el análisis comparado a especies tanto de alimentación herbívora como carnívora, ya que la condición ligada de presa o depredador puede influir en la organización y funcionamiento del SVN. De hecho, debido a su estrategia de supervivencia, cada especie se especializa en unos determinados semioquímicos, los cuales podrían llegar a influir en la conformación y las características del SVN. Adicionalmente, tanto los herbívoros como los carnívoros presentan hábitos específicos relacionados con su tipo de alimentación, por lo que resulta interesante valorar si estas prácticas se reflejan en particularidades propias a nivel del SVN.

6) Asimismo, comparar el SVN de especies terrestres y semiacuáticas fue otro objetivo. Tanto la solubilidad como la volatilidad son dos características destacadas en la comunicación química, que pueden alterar los mecanismos y estrategias de percepción, y en consecuencia, modificar las estructuras de los sistemas receptores. Por ello, resulta esencial describir la topografía y los detalles anatómicos propios del SVN en especies tanto terrestres como de hábitos semiacuáticos, con el objetivo de reconocer posibles adaptaciones y variaciones que hayan podido tener lugar. En este caso, hemos contado con el capibara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) como mamífero semiacuático.

Como resultado de lo aquí expuesto los objetivos citados culminaron en cuatro investigaciones en diferentes órdenes de mamíferos.

El capibara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), un roedor silvestre, fue seleccionado para valorar la influencia de la domesticación. Se pretende comparar su SVN con el de los ratones o ratas de laboratorio, y cuestionar la validez del modelo de SVN de los múridos como modelo general entre los roedores. Por otro lado, se emplearon individuos neonatos con el fin de obtener información en dicho periodo. Finalmente, al tratarse de una especie semiacuática se podrá analizar la influencia de estos comportamientos en su SVN.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Para el siguiente estudio seleccionamos un marsupial diprotodonto, el ualabí de Bennett (*Notamacropus rufogriseus*), debido a que un estudio reciente en el SVN del ualabí de Tammar (*Notamacropus eugenii*) mostró un hallazgo controvertido con respecto a las familias de receptores vomeronasales que manifiesta. Por otra parte, nuestro estudio ofrece una visión más detallada tanto a nivel del OVN como del BOA, ya que incorpora nuevas tinciones y marcadores que amplían y refuerzan los datos morfofuncionales previos.

A continuación, examinamos un carnívoro salvaje del que no existe información morfofuncional sobre su SVN, la suricata (*Suricatta suricata*). En esta ocasión, se trata de una especie con marcadas costumbres sociales que invierte gran parte de su tiempo en densas redes de túneles, donde la ausencia de luz proporciona a los sistemas químicos una mayor relevancia. Esto nos permite profundizar en el conocimiento del SVN en un modelo de mamífero fosorial. Asimismo, la suricata originó una disparidad histórica en relación con su ubicación taxonómica, siendo la especie identificada como cánido o félido de forma indiferente. El estudio del SVN se puede emplear como herramienta de clasificación filogenética, por ello, aunque actualmente la suricata se considera feliforme, resulta interesante su investigación de cara a verificar la postura actual.

Finalmente, se examinó el SVN de la gacela dama (*Nanger dama*), un herbívoro silvestre en peligro de extinción. En este caso, tampoco existen estudios previos al respecto, por lo que se pretende caracterizar la neuroanatomía de su SVN, lo que se espera sea un primer avance hacia el desarrollo de una tecnología basada en feromonas que contribuya a mejorar su situación actual. Es decir, emplear estas sustancias para mejorar los parámetros reproductivos en centros de recuperación y reducir sus niveles de estrés. De este modo, nuestra investigación podría ser de gran utilidad en un futuro cercano.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3 MATERIAL Y MÉTODOS

A través de una colaboración con el Parque Natural de Marcelle (Outeiro de Rei, España), hemos aprovechado las diferentes bajas por muerte natural para disponer de una gran variedad de especies en nuestras investigaciones. De este modo, hemos contado con tres capibaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) de un día de edad, dos ejemplares adultos de ualabí de Bennett (*Notamacropus rufogriseus*), tres suricatas (*Suricata suricatta*) adultas y una gacela dama (*Nanger dama*) adulta. Asimismo, se emplearon tanto hembras como machos en los estudios realizados y en ningún caso transcurrieron más de ocho horas entre la defunción y el procesamiento de las muestras.

3.1 EXTRACCIÓN Y DISECCIÓN DE LAS MUESTRAS

A continuación, se detalla el procedimiento seguido para extraer y diseccionar las muestras de los individuos investigados. Inicialmente, las cabezas se separan del cadáver y se retira la piel, la mandíbula, los planos musculares de cara y cráneo y estructuras como la lengua y los ojos. A continuación, se abre una ventana en la parte dorsal del cráneo próxima a los bulbos olfativos, la cual se amplía hacia la parte dorsolateral de la cavidad nasal. Esto permite que el fijador pueda acceder al interior del cráneo, y penetrar de forma adecuada en las estructuras que nos interesan, tales como los órganos vomeronasales y los bulbos olfativos. Los fijadores empleados fueron tanto el formol al 10% como el líquido de Bouin recién preparado. La composición de este fijador consistía en 750 ml de ácido pícrico saturado, 250 ml de formol y 50 ml de ácido acético, por cada 1050 ml de solución.

El fijador de Bouin está especialmente indicado para el estudio del sistema nervioso debido a su gran capacidad de penetración tisular y su aporte de consistencia al tejido, lo que facilita su procesamiento. Asimismo, preserva la estructura de los tejidos blandos y delicados, por lo que resulta de interés para las muestras de tejido nervioso. De cara a la realización de tinciones inmunohistoquímicas presenta la ventaja adicional de preservar efectivamente los epítopos antigénicos en los tejidos pues los compuestos en la solución de Bouin pueden formar enlaces cruzados con las proteínas en los tejidos, estabilizándolos y preservando su estructura nativa. Esto evita la necesidad de realizar técnicas de recuperación antigénica. Una vez transcurridas veinticuatro horas, las muestras se transfieren a etanol al 70 % para su correcto mantenimiento.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Antes de proceder a la fijación se evaluó la funcionalidad del canal incisivo, el cual conecta las cavidades oral y nasal, a través de una canulación por la papila incisiva. Una vez detallada esta característica anatómica relacionada con el SVN, se procede a la extracción de las siguientes estructuras anatómicas: los órganos vomeronasales (OVN) y los bulbos olfativos (BO).

3.1.1 Cavidad nasal

La cavidad nasal se separó del cráneo mediante una incisión transversal realizada rostralmente a la fosa etmoidal, para evitar ocasionar daños en los bulbos olfativos con la sierra rotatoria. En algunos individuos, la muestra resultante se utilizó para estudiar los cambios macroscópicos y microscópicos en la topografía del OVN a lo largo de la cavidad nasal. Con este objetivo, se sometió la cavidad nasal a una descalcificación para su posterior estudio histológico seriado.

3.1.2 Órganos y nervios vomeronasales

En los especímenes no descalcificados la cavidad nasal siguió un procedimiento orientado a la identificación y la extracción de ambos órganos vomeronasales intactos. En este caso, se abre lateralmente la cavidad nasal y se procede a extraer los cornetes nasales. Esto permite la visualización del tabique nasal en su totalidad, sobre el cual se diseccionaron los nervios vomeronasales y se describió su trayecto hacia los BOA. Asimismo, una vez identificados los OVN, a ambos lados de la base anterior del tabique nasal, se extrajeron con la ayuda de un microscopio quirúrgico (Zeiss OPMI 1 Ent), debido a su pequeño tamaño y al estrecho contacto que tienen con el hueso vómer.

3.1.3 Bulbos olfativos principales y accesorios

De cara al estudio macroscópico de las áreas cerebrales relacionadas con el olfato, se procede a la extracción completa del cerebro y los bulbos olfativos. Para ello, los huesos de la bóveda craneal se retiran con la ayuda de una sierra rotatoria y una pinza gubia, dejando accesibles los hemisferios cerebrales. Se comienza la extracción caudalmente para aprovechar la menor resistencia que presenta el hueso a este nivel. El siguiente paso es la disección cuidadosa de los bulbos olfativos de su ubicación oculta en la fosa etmoidal. Estos son particularmente delicados y, además, los nervios olfativos y vomeronasales, que atraviesan la lámina cribosa del etmoides, los anclan firmemente a la duramadre. Por este motivo, comenzamos con la extracción del hueso de la fosa orbitaria que recubre lateralmente los bulbos olfativos. Una vez expuestos ambos bulbos y con la ayuda de un bisturí, se diseccionaron la duramadre y los nervios olfativos, con el objetivo de liberar dichas estructuras de la lámina cribosa etmoidal. Finalmente, se seccionan los nervios ópticos, las arterias carótidas internas, el tallo pituitario y los nervios craneales que emergen de ambos lados del tronco encefálico, dejando el cerebro libre.

USC DE COMPOSTELA

3.2 PROCESAMIENTO Y CORTE DE LAS MUESTRAS

Se utilizó la inclusión en parafina para realizar el procesamiento histológico de todas las muestras, dando como resultado varios bloques con las CN, los OVN y los BO. En cambio, las cavidades nasales destinadas al estudio seriado, se sumergen previamente en una solución descalcificadora (Shandon TBD-1 Decalcifier, Thermo, Pittsburgh, PA, EE. UU.), en continua agitación y durante el tiempo necesario. El objetivo es que la cuchilla sea capaz de seccionar sin dificultad la parte ósea de la cavidad nasal, por ello, dependiendo de la especie y la edad del individuo puede ser necesario que el descalcificador actúe desde un día a más de una semana. A continuación, las muestras se lavaron con agua corriente durante dos horas y se realizaron una serie de cortes transversales equidistantes en la CN desde su extremo rostral hasta el extremo caudal del cartílago vomeronasal, obteniendo varios bloques que fueron fotografiados. Cada bloque contiene un nivel del OVN, lo que permite obtener información sobre las características anatómicas y las relaciones topográficas que presenta el OVN a lo largo de toda la cavidad nasal. Al completar dicho proceso, los bloques fueron embebidos en parafina.

Respecto al corte de las muestras, se empleó el micrótomo Leica Reichert Jung, que nos permitió obtener secciones de un espesor de 4 a 8 μm (micrómetros). En el caso del OVN optamos por cortes más finos, en cambio, para el estudio del BO se practicaron cortes de un mayor grosor, ya que esto facilita una mejor visualización de los procesos nerviosos y gliales.

Los cortes resultantes se montaron en portaobjetos recubiertos de gelatina, con la finalidad de que se mantengan adheridos durante todo el proceso al que se verán sometidos. Por otro lado, los OVN y los BO se cortaron tanto en planos sagitales como transversales. Esto nos permite tener una visión más completa y en el caso del BOA, facilita su identificación en el BO.

3.3 TINCIONES HISTOLÓGICAS

Los tejidos animales son en su gran mayoría incoloros, excepto aquellos que poseen algún tipo de pigmento como la melanina de la epidermis o la hemoglobina de la sangre. Por consiguiente, para visualizar las diferentes estructuras que conforman una sección histológica, es necesario producir un contraste artificial y diferencial entre los distintos componentes del tejido. De este modo, utilizamos varias tinciones generales y específicas que resaltan con diversas coloraciones los elementos tisulares. Como tinciones generales hemos empleado la hematoxilina-eosina (HE), el ácido peryódico de Schiff (PAS) y el azul alcián (AA), y como tinciones específicas, el tricrómico de Gallego, el Nissl y la tinción de Tolivia.

3.3.1 Tinciones generales

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.3.1.1 Hematoxilina-eosina (HE)

Se utiliza como tinción histológica general. Consta de dos colorantes, uno de carácter básico, la hematoxilina, que tiñe de azul violáceo oscuro las estructuras basófilas (ácidas) como el ADN o el ARN. Y por otro lado, la eosina, que tiene carácter ácido y marca de color rosa las estructuras acidófilas (básicas) como el citoplasma y las estructuras extracelulares. De este modo, se puede obtener una visión clara y diferencial de la histología celular.

3.3.1.2 Ácido peryódico de Schiff (PAS)

Se trata de una tinción histológica que evidencia la presencia de mucopolisacáridos de carácter neutro. Está constituida por un colorante incoloro, la leucofucsina, que se torna de color magenta cuando establece contacto con los polisacáridos del tejido.

El protocolo utilizado comprendió los siguientes pasos y tiempos:

Los cortes se desparafinaron y se rehidrataron para sumergirlos en ácido periódico durante cuarenta y cinco minutos. A continuación, se realiza un lavado con agua destilada y se introducen en reactivo de Schiff durante una hora. Posteriormente, se lavan las muestras en agua corriente, se deshidratan y se montan.

3.3.1.3 Azul alcián (AA)

Es un colorante de carácter básico, comúnmente utilizado para la detección de carbohidratos mediante procesos histoquímicos. El color azul que lo caracteriza es resultado de la presencia de cobre en la molécula que lo constituye, y permite diferenciar los mucopolisacáridos de naturaleza ácida.

El protocolo consistió en desparafinar e hidratar los cortes para posteriormente teñirlos durante 30 minutos con la solución de Azul Alcián. Seguidamente, se lavan los portas en agua corriente, se deshidratan mediante la batería de alcoholes con una graduación ascendiente y se montan.

3.3.2 Tinciones específicas

Mientras las tinciones generales se emplean de manera estándar o rutinaria, las tinciones específicas se caracterizan por resaltar una o varias cualidades concretas del tejido a investigar.

3.3.2.1 Tricrómico de Gallego

Esta técnica nos permite distinguir fundamentalmente los componentes del tejido conjuntivo como las fibras colágenas y elásticas. En muestras sin descalcificar, los eritrocitos se tiñen de verde, las fibras musculares y el colágeno de azul claro, el epitelio y el tejido glandular de rojo, el hueso de azul oscuro y el cartílago de color púrpura. En cambio, en muestras descalcificadas el patrón varía ligeramente. En tal caso, el tejido glandular y el

USC DE COMPOSTELA

cartílago se marcan de azul claro, las fibras musculares de verde, y los epitelios de azul (Ortiz-Hidalgo, 2011).

El protocolo utilizado fue el siguiente. Los cortes se desparafinaron y se rehidrataron para teñir con fucsina acética Ziehl durante dos minutos (diez gotas de fucsina Ziehl, una gota de ácido acético y 10 cc de agua destilada). Después de lavarlos con agua destilada, se introdujeron en solución de formalina-ácido acético durante cinco minutos (dos gotas de formalina, dos gotas de ácido acético glacial y 10 cc de agua destilada). Posteriormente, las secciones se someten a otros dos lavados, y se sumergen en picro-índigo-carmín durante tres a cinco minutos (una parte de solución acuosa de índigocarmín al 1 % y dos partes de solución acuosa saturada de ácido pícrico). Por último, los cortes se deshidratan, se aclaran y se montan para su posterior visualización en el microscopio.

3.3.2.2 Tinción de Nissl

Esta tinción específica se emplea con el fin de visualizar el soma y el inicio de los procesos neuronales. Por este motivo, la tinción de Nissl es una de las tinciones más empleadas en secciones de tejido nervioso. El colorante principal que utiliza es el violeta de cresilo, que posee una elevada afinidad por los cuerpos de Nissl. Estas estructuras son cúmulos de retículo endoplasmático rugoso (RER) presentes en el citoplasma de las neuronas.

3.3.2.3 Tinción de Tolivia

Se trata de otra de las tinciones más utilizadas para el análisis del tejido nervioso. En este caso, la tinción de Tolivia tiñe las fibras nerviosas mielínicas de color negro y los somas neuronales de color rosado. De este modo, permite obtener una mejor visión de la arquitectura nerviosa que presenta el tejido investigado.

El protocolo seguido se describe a continuación. Para favorecer la fijación de los colorantes, las secciones se introdujeron en $FeNH_4$ (SO_4) 2 al 2,5% durante una hora. Posteriormente, las muestras se sumergen durante dos horas y media en una solución de tinción de mielina recién preparada. Esta solución está constituida por cinco mililitros de hematoxilina al 20 %, diez mililitros de Li_2CO_3 al 1% y cincuenta mililitros de etanol al 50%. A continuación, se realizan tres lavados en agua corriente durante cinco minutos y se introducen los portaobjetos en un baño de solución de pironina al 0,2% en formaldehído al 20% durante cinco minutos. Finalmente, las muestras fueron deshidratadas, aclaradas y montadas.

3.4 TINCIONES HISTOQUÍMICAS E INMUNOHISTOQUÍMICAS

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.4.1 Tinciones histoquímicas

El marcaje histoquímico de lectina se basa en la unión que se establece entre estas proteínas y los hidratos de carbono que se pueden encontrar libres, en oligosacáridos o en glicoproteínas. Por ello, las lectinas son moléculas de origen natural que se utilizan para detectar glicoconjugados en los diferentes componentes tisulares.

En nuestras investigaciones hemos realizado un análisis histoquímico con las siguientes lectinas. La aglutinina de *Ulex europaeus* (UEA), que proviene de la aulaga, reconoce la α-L-fucosa (Alroy *et al*., 1986). La isolectina B_4 de *Bandeiraea simplicifolia* (BSI-B_4), extraída de las semillas de la leguminosa arbustiva *Griffonia simplicifolia*, muestra afinidad por la α-galactosa terminal (Peters & Goldstein, 1979). La aglutinina de *Lycopersicon esculentum* (LEA), proveniente del tomate, presenta una elevada afinidad por los oligómeros de N-acetil-β-D-glucosamina (Salazar & Sánchez-Quinteiro, 2003). La aglutinina de *Vicia villosa* (VVA), presente en las semillas de la leguminosa veza vellosa, reconoce la N -acetilgalactosamina terminal. La lectina de la soja, *Soybean agglutinin* (SBA), se une a estructuras de oligosacáridos con N-acetilgalactosamina unida a α o β terminal y, en menor medida, a residuos de galactosa. Finalmente, se empleó la lectina de la patata, *Solanum tuberosum* (STA), que se une a oligómeros de N-acetilglucosamina y a los oligosacáridos de la pared celular bacteriana que contienen N -acetilglucosamina y ácido N -acetilmurámico (Tabla 1). Estas lectinas, marcan selectivamente los diferentes componentes de las vías olfativas y vomeronasales en algunas especies. Por este motivo, se han utilizado tanto en secciones de OVN como de BOA.

A continuación, se detalla el protocolo seguido para analizar cada lectina. En el caso de la UEA se siguió un procedimiento basado en la utilización de un anticuerpo frente a la lectina. Una vez desparafinadas y rehidratadas las muestras, se comienza (i) bloqueando la actividad de la peroxidasa endógena presente en el tejido con la finalidad de evitar posibles interferencias con la solución de revelado. Para ello, los cortes se incuban en solución de agua oxigenada (H_2O_2) al 3% durante diez minutos. Posteriormente, se introducen (ii) durante treinta minutos en albúmina de suero bovino (BSA) al 2%, para evitar las uniones no específicas. El siguiente paso (iii), consiste en incubar con la lectina UEA durante una hora a temperatura ambiente para visualizar la unión lectina-carbohidrato, seguido de (iv) tres lavados de cinco minutos en tampón de fosfato 0,1 M (PB, pH 7,2). Una vez realizados los lavados, las secciones se sumergen (v) durante doce horas a 4ºC en una inmunoglobulina conjugada con peroxidasa frente a la aglutinina UEA. Finalmente, las secciones se lavaron (vi) con tampón fostato y se revelaron (vii) en una solución de diaminobencidina (DAB) al 0,05% y H_2O_2 al 0,003% durante cinco minutos.

El protocolo para analizar el resto de las lectinas empleadas, LEA, BSI-B_4, VVA, SBA y STA, comienza con los mismos dos pasos que el protocolo anterior de la UEA. Una vez suprimida la actividad de la peroxidasa endógena tisular (i) y eludidas las uniones no específicas (ii), se incuban (iii) los portaobjetos durante doce horas a 4ºC con las aglutininas biotiniladas de LEA o BSI-B_4 diluidas en una solución de BSA al 0,5%. El siguiente paso consiste en incubar (iv) las secciones en el reactivo Vectastain ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE. UU.) durante una hora y media. Finalmente, se revelan (v) las muestras en la solución de diaminobencidina (DAB) al 0,05% y H_2O_2 al 0,003% durante unos cinco minutos. Es conveniente controlar el tiempo de revelado, observando a través del microscopio las muestras hasta que la reacción produzca la intensidad de color deseada.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Se realizaron controles para todos los protocolos, tanto sin adición de lectinas como con preabsorción de lectinas, utilizando una cantidad en exceso del azúcar correspondiente.

3.4.2 Tinciones inmunohistoquímicas

El estudio inmunohistoquímico abarcó un número considerable de anticuerpos, que proporcionan información valiosa sobre las características morfofuncionales del sistema olfativo principal y del sistema vomeronasal.

Las proteínas Gαi2 y Gαo están ligadas a las familias de receptores de feromonas V1R y V2R, respectivamente. De este modo, su análisis permite determinar qué familias de receptores vomeronasales se expresan en el SVN. La neuroplasticidad y el crecimiento neuronal se investigaron empleando la proteína 43 asociada al crecimiento (GAP-43) (Benowitz *et al*., 1990). La madurez del sistema se determinó utilizando proteína marcadora olfativa (OMP) (Albeanu *et al*., 2018). Las proteínas de unión al calcio calbindina (CB), calretinina (CR), parvalbúmina (PV) y secretagoguina (SG), se utilizaron para identificar subpoblaciones neuronales (Andressen *et al*., 1993). El marcador de proteínas de neurofilamentos (SMI-32), se expresa en las células mitrales del BO de algunos mamíferos. Asimismo, tanto el soma como las dendritas de las células mitrales se marcaron con anticuerpos frente a la proteína 2 asociada a microtúbulos (MAP-2). Los astrocitos y las células envolventes se identificaron mediante un anticuerpo contra la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Zhang *et al*., 2017). El marcaje de las células mitrales se realizó con anticuerpos frente a la proteína 2 asociada a microtúbulos (MAP-2). Se analizó el marcaje del PGP 9.5 para visualizar diferentes poblaciones y subtipos neuronales (Lundberg *et al*., 1988). Por último, se estudió el marcador citoqueratina-7, asociado a procesos patológicos y tumorales (Mathers *et al*., 2002).

Después de desparafinar y rehidratar las muestras, el procedimiento seguido comenzó bloqueando la actividad de la peroxidasa endógena. Los portaobjetos se dejaron durante diez minutos en una solución de peróxido de hidrógeno al 3 % en agua destilada (i). Asimismo, las uniones no específicas se bloquearon con el suero de caballo que incluye el kit ImmPRESS VR Anti-mouse IgG/Anti-rabbit IgG (Vector Laboratories, CA, EE. UU.) (ii). Posteriormente, se agregó el anticuerpo primario a la dilución correspondiente para incubar las preparaciones durante toda la noche en una cámara húmeda a 4°C (iii). A la mañana siguiente, las muestras se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente con el correspondiente reactivo ImmPRESS VR Polymer HRP anti-rabbit IgG (iv). Por último, después de enjuagar en tampón Tris (pH 7,61) durante 10 min (v), la reacción se visualizó mediante la incubación en una solución de 3,30-diaminobencidina (DAB) al 0,05 % y una solución de H_2O_2 al 0,003 %, en tampón Tris-HCl 0,2 M (vi). El cromógeno DAB se transforma en un precipitado marrón que se deposita en las áreas marcadas. Adicionalmente, el análisis de ciertos anticuerpos se complementó con una contratinción de hematoxilina, lo que permitió obtener una mejor caracterización de la imagen obtenida. Asimismo, facilita delimitar y contextualizar el marcaje en el tejido.

Todos los protocolos inmunohistoquímicos se verificaron a través de los controles apropiados. Se utilizaron como controles negativos muestras en las que se omitió el anticuerpo

primario, sin obtener en ningún caso marcaje ni antecedentes inespecíficos. Por otro lado, como controles positivos, replicamos el procedimiento inmunohistoquímico en tejidos de ratón conocidos por expresar las proteínas de interés, y obtuvimos la positividad esperada.

3.5 MICROSCOPÍA DE BARRIDO CON LÁSER CONFOCAL

Las figuras con autofluorescencia en las fibras elásticas del OVN se realizaron mediante microscopía de barrido láser confocal. Después de criopreservar las muestras en sacarosa al 30%, se cortaron en un micrótomo deslizante a 40 µm de espesor y se almacenaron en PB 0.1 M, pH 7.2, a 4 °C hasta el procesamiento de flotación libre. Las secciones se contrastaron con yoduro TO-PRO-3 (1 µM; Molecular Probes, T3605) durante quince minutos y se montaron en una solución de desvanecimiento lento (Molecular Probes Cat. # S7461). Se empleó la configuración de Bio-Rad MRC 1024 ES para fluorescencia de dos canales con autofluorescencia verde y ajustes de filtro de yoduro TO-PRO-3 (fluorescencia de rojo lejano) (láser de Ar de 100 mW, longitud de onda de 488 nm y láser de He-Ne, longitud de onda de 633 nm). Las imágenes se tomaron utilizando una lente de 20 × (NA 0,45) en un microscopio invertido Nikon TE 2000, con filtrado de emisión independiente para cada tipo de fluorescencia (RIAIDT, Universidad de Santiago de Compostela, España).

3.6 ADQUISICIÓN DE IMÁGENES Y TRATAMIENTO DIGITAL

Las imágenes digitales se tomaron utilizando la cámara digital Karl Zeiss Axiocam MRc5 acoplada a un microscopio Zeiss Axiophot. Se utilizó Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems, San José, CA, EE. UU.) según fue necesario para ajustar parámetros como el brillo o el contraste, equilibrar los niveles de luz y recortar o cambiar el tamaño de las imágenes para su presentación en el formato final. No se alteraron ni se introdujeron características específicas dentro de las imágenes. Por otro lado, ciertas fotomicrografías se formaron como un mosaico de varias fotografías fusionadas con la ayuda de dos softwares de unión de imágenes (PTGui Pro, New House Internet Services BV, Países Bajos y AutoStich).

Tabla 1. Lectinas y anticuerpos empleados. Especies de elaboración, diluciones, fabricante, número de catálogo.

Lectina/Ac	Especie del 1º Ac/dilución	Número de catálogo del 1º Ac	Especie del 2º Ac/dilución (Número de catálogo)
Anti-Gαo	Conejo 1:100	MBL 551	ImmPRESS VR HRP Anti-Conejo IgG Reagent MP-6401-15
Anti-Gαi2	Conejo 1:100	Sta Cruz Biotechnology SC-7276	ImmPRESS VR HRP Anti-Conejo IgG Reagent MP-6401-15

USC UNIVERSITAT DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Anti-OMP	Cabra 1:400	Wako S44-10001	Caballo 1:250 Vector BA-9500
Anti-MAP2	Ratón 1:200	Sigma M4403	ImmPRESS VR HRP Anti-Ratón IgG Reagent MP-6402-15
Anti-GAP43	Ratón 1:800	Sigma G9264	ImmPRESS VR HRP Anti-Ratón IgG Reagent MP-6402-15
Anti-GFAP	Conejo 1:400	Dako Z0334	ImmPRESS VR HRP Anti-Conejo IgG Reagent MP-6401-15
Anti-Calbindina	Conejo 1:5000	Swant CB38	ImmPRESS VR HRP Anti-Conejo IgG Reagent MP-6401-15
Anti-Calretinina	Conejo 1:5000	Swant 7697	ImmPRESS VR HRP Anti-Conejo IgG Reagent MP-6401-15
Anti-Parvalbúmina	Conejo 1:400	Proteintech 26521-1-AP	ImmPRESS VR HRP Anti-Conejo IgG Reagent MP-6401-15
Anti-Secretagoguina	Conejo 1:1000	Gift from Ludwig Wagner (University of Vienna, Austria)	ImmPRESS VR HRP Anti-Conejo IgG Reagent MP-6401-15
Anti-Citoqueratina 8	Conejo 1:200	Proteintech 17514-1-AP	ImmPRESS VR HRP Anti-Conejo IgG Reagent MP-6401-15
Anti- PGP 9.5	Conejo 1:200	Proteintech 14730-1-AP	ImmPRESS VR HRP Anti-Conejo IgG Reagent MP-6401-15
Anti-LHRH	Conejo 1:500	Fisher Scientific A235481	ImmPRESS VR HRP Anti-Conejo IgG Reagent MP-6401-15
Anti-SMI32	Conejo 1:20	ENZ-ABS219-0100	ImmPRESS VR HRP Anti-Conejo IgG Reagent MP-6401-15
Anti-Enolasa	Ratón 1:100	Santa Cruz Biotechnology sc-21738	ImmPRESS VR HRP Anti-Ratón IgG Reagent MP-6402-15
UEA-I*	1:10	Vector L-1060	Conejo 1:50 DAKO P289
LEA*	20 µg/ml	Vector B-1175	Vectastain ABC reagent PK-4000
BSI-B_4*	100 µg/ml	Sigma L-2140	Vectastain ABC reagent PK-4000
VVA	1:150	Vector B-1235	Vectastain ABC reagent PK-4000
STA	1:150	Vector-B1165	Vectastain ABC reagent PK-4000
SBA	1:150	Vector-B1015	Vectastain ABC reagent PK-4000

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4 PUBLICACIONES

Tabla 2. Datos de las cuatro publicaciones que componen la tesis doctoral.

	PUBLICACIÓN1	PUBLICACIÓN 2	PUBLICACIÓN3	PUBLICACIÓN 4
Revista	**Scientific Reports**	**Brain, Structure and Function**	**Animals**	**Microscopy Research Technique**
Año de publicación	**2020**	**2022**	**2022**	**2023**
IF	4.380	3.1	3.0	2.5
IF a 5 años	5.134		3.2	
Cuartil	Q1 - 17/72 Multidisciplinary Sciences	Q1 (D1) - 1/20 Anatomy & Morphology	Q1 (D1) - 12/62 Agriculture, Dairy & Animal Science Q1 (D1) - 13/143 Veterinary Sciences	Q1 - 5/20 Anatomy & Morphology
Nº de citas en Google Scholar	18	8	5	0
Nº de citas en WOS	8	6	3	0
Nº de citas en Scopus	8	3	3	0
OA	Sí	Sí (Golden OA)	Sí	Sí (Golden OA)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.1 PUBLICACIÓN NÚMERO 1

Torres, M. V., Ortiz-Leal, I., Villamayor, P. R., Ferreiro, A., Rois, J. L., & Sanchez-Quinteiro, P. The vomeronasal system of the newborn capybara: A morphological and immunohistochemical study. *Scientific Reports* 10(1), 13304 (2020).

https://doi.org/10.1038/s41598-020-69994-w

Revista: Scientific Reports

Año de publicación: 2020

Editorial: Springer Nature

ISSN: 2045-2322

Citas en Google Scholar: 18

Índices de calidad de la revista:

Factor de impacto (2020): 4.380

Factor de impacto de 5 años (2020): 5.134

Categoría (2020):

Multidisciplinary Sciences Q1 (17/72)

Contribución del doctorando: M. V. T. diseñó la investigación, realizó el trabajo, analizó y discutió los resultados y escribió el artículo.

Autorización de la revista/editorial: Contenido reproducido bajo las condiciones de Copyright (2020) Creative Commons Attribution (CC BY 4.0).

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

SCIENTIFIC REPORTS
nature research

Check for updates

OPEN

The vomeronasal system of the newborn capybara: a morphological and immunohistochemical study

Mateo V. Torres[1], Irene Ortiz-Leal[1,3], Paula R. Villamayor[1,3], Andrea Ferreiro[2], José Luis Rois[2] & Pablo Sanchez-Quinteiro[1]✉

The vomeronasal system (VNS) is responsible for the perception mainly of pheromones and kairomones. Primarily studied in laboratory rodents, it plays a crucial role in their socio-sexual behaviour. As a wild rodent, the capybara offers a more objective and representative perspective to understand the significance of the system in the Rodentia, avoiding the risk of extrapolating from laboratory rodent strains, exposed to high levels of artificial selection pressure. We have studied the main morphological and immunohistochemical features of the capybara vomeronasal organ (VNO) and accessory olfactory bulb (AOB). The study was done in newborn individuals to investigate the maturity of the system at this early stage. We used techniques such as histological stains, lectins-labelling and immunohistochemical characterization of a range of proteins, including G proteins (Gαi2, Gαo) and olfactory marking protein. As a result, we conclude that the VNS of the capybara at birth is capable of establishing the same function as that of the adult, and that it presents unique features as the high degree of differentiation of the AOB and the active cellular migration in the vomeronasal epithelium. All together makes the capybara a promising model for the study of chemical communication in the first days of life.

The vomeronasal system (VNS) is the sensorial system responsible in most vertebrates for the detection of chemosensory signals linked to innate socio-sexual behaviours[1,2]. In mammals, the VNS presents a high morphofunctional[3] and genomic[4] diversity among different species. The vomeronasal organ (VNO) specialises in detecting pheromones for the purpose of reproductive behaviours such as maternal aggression and sexual attraction[5]. The VNS is also involved in the recognition of major histocompatibility complex (MHC) associated peptides[6], kairomones[7] and aversive molecules[8].

By performing an in-depth study of the macroscopic and microscopic morphological characteristics of the vomeronasal system in the newborn capybara, we aimed to achieve two objectives. On the one hand, we aimed to obtain general information regarding the vomeronasal system in a rodent model that is distinct from most studied laboratory rodents. On the other hand, because the capybara is a precocial animal species, we aimed to determine the degree to which the capybara vomeronasal system morphology at birth has adapted to the requirements of a demanding socio-cognitive environment.

Most studies of the VNS have been done on laboratory rodent strains, exposed to artificial selection pressure that do not reflect the selection pressure present in the wild. Therefore, these laboratory strains present significant genetic and behavioural differences compared with wild rodent models[9]. The laboratory mouse (*Mus musculus*) and rat (*Rattus norvegicus*) may not be representative of all animals that make up this family.

A remarkable differential feature among rodents is the altricial character of mice and rats, compared with the precocial character presented by hystricomorphic rodents, such as the guinea pig or capybara[10]. Altricial neonates lack fully developed senses and require extensive parental care, such as brooding or food provisioning. In contrast, precocial species are born with more developed senses, require limited parental care, and can feed

[1]Department of Anatomy, Animal Production, and Clinical Veterinary Sciences. Faculty of Veterinary, University of Santiago de Compostela, Av Carballo Calero s/n, 27002 Lugo, Spain. [2]Marcelle Nature Park, Outeiro de Rei, Lugo, Spain. *These authors contributed equally: Irene Ortiz-Leal and Paula R. Villamayor. ✉email: pablo.sanchez@usc.es

self-sufficiently, early on, while still being nursed[11]. Differences in the maturation of sensory systems between altricial and precocial species may provide insight regarding behavioral development patterns, in both groups.

Both the main olfactory and vomeronasal systems act synergistically and constantly interact during development[12]. Although the age at which the main olfactory system acquires adult-like morphology has been well-established to demonstrate a more-organized system at an earlier postnatal age among precocial species compared with altricial rodents[13,14], less information is available regarding the VNS during the early postnatal development of different rodent species. The development of the VNS has been exclusively assessed in immature altricial species, including the mouse and rat[15],however, no studies have examined the morphological and functional maturity of the VNS in precocial rodents during the perinatal period.

Hystricognathi has become a model group for the study of the anatomical diversity of the VNS, as shown by the studies in chinchillas[16,17], guinea pigs[18], degus[19,20], and mole rats[21,22]. Suárez et al.[23] paid special attention to the organisation of the first integrative centre of the VNS, the accessory olfactory bulb (AOB) in capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris*, particularly to the morphometry of the anteroposterior zonation, which is determined by the expression of the G proteins. These authors showed how the Gαo-positive AOB caudal subdomain in capybaras is larger than the rostral subdomain, which differs from the *Octodon degus* AOB, which presents a larger Gαi2 anterior region. Whereas capybaras are semi-aquatic mammals, whose chemocommunication relies mostly on the oily secretions associated with male-to-male pheromonal communications, the degus lives in semiarid spaces and prevalently establishes male–female interactions. Therefore, this study suggests that ecological specialisations may play important roles in shaping the AOB.

The present study describes the anatomy, histology, and histochemical and immunohistochemical features of the VNS of the newborn capybara and discusses its functional status at birth. We employed dissection, microdissection, histological staining and immunohistochemical techniques. Three lectins were studied: *Ulex europaeus* agglutinin (UEA), specific for the canid vomeronasal system[24],*Bandeiraea simplicifolia* isolectin B_4 (BSI-B_4), which marks the VNS in both rats[25] and opossums[26],and *Lycopersicon esculentum* agglutinin (LEA), a specific marker for both olfactory systems.

The immunohistochemical study covered a large number of antibodies, which provides useful information on VNS function. Antibodies against Gαi2 and Gαo, were used to determine which pheromone receptor families—V1R[27] or V2R[28], respectively—are expressed in the VNS. The mitral cells, primary neural elements of the AOB, were labelled with antibodies against microtubule-associated protein 2 (MAP-2). The neuronal growth, especially important during the first stages of life, was studied by employing anti-growth-associated protein 43 (GAP-43) and anti-Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH). The maturity of the system was determined using anti-olfactory marker protein (OMP). The calcium-binding proteins calbindin (CB) and calretinin (CR) were used to identify neuroactive substances. Astrocytes and ensheathing cells were recognised by an antibody against glial fibrillary acidic protein (GFAP).

Our study aimed to address current gaps in our understanding of the rodent vomeronasal development, through ontogeny, by providing essential information regarding the newborn capybara VNS, showing that this species presents an advanced stage of structural maturity during the first days of life. The macroscopic, histological and immunohistochemical peculiarities and differences from the VNS of mice and rats demonstrate the wide diversity of the VNS between even closely related species, supporting the necessity of studying each species individually to avoid making incorrect extrapolations.

Material and methods

Through a collaboration with Marcelle Nature Park (Outeiro de Rei, Spain), we were provided with three one-day-old capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) for use in this study. The animals died by perinatal causes, and they were two males and one female.

The heads were separated and introduced into the fixative after removing the jaws and extracting the skin, muscular plane and other structures such as the tongue and eyes. A window was opened dorsally in the skull in the proximity of the olfactory bulbs to facilitate the penetration of the fixative. The fixatives used were 10% formol and freshly prepared Bouin's fixative. The latter is especially suitable for the study of the nervous system due to its superior penetration capacity and because it lends consistency to the tissues, thus facilitating its subsequent processing. After 24 h, the samples were transferred into 70% ethanol.

Sample extraction. We focused the extraction of the samples on the following anatomical structures: the nasal cavity (NC), vomeronasal organ (VNO), vomeronasal nerves, and olfactory bulbs (OBs).

Nasal cavity The entire NC was separated by a transverse incision made rostrally to the ethmoidal fossa to prevent damage to the olfactory bulbs. The resulting sample was used to study the macroscopic and microscopic changes in the topography of the VNO throughout the NC.

Vomeronasal organ and nerves After opening the NC using a rotating saw, the dorsal and ventral turbinates were removed. This allowed the visualisation of the nasal septum in its entirety, over which the vomeronasal nerves were dissected. Once the VNOs were identified on both sides of the base of the anterior portion of the nasal septum—and because of their small size and the close contact they have with the vomer bone—it was necessary to extract them with the help of a surgical microscope (Zeiss OPMI 1 Ent).

Main and accessory olfactory bulbs The complete removal of the cranial vault was performed using a gouge forceps. It was begun caudally to take advantage of the lower resistance presented by the bone at this level. Special care was taken when approaching the OBs, located deep in the ethmoidal fossa, since they are extremely delicate. To access the OBs, the bony orbital fossa, which laterally covers the bulbs was removed. Finally, using a scalpel, the dura mater and the olfactory nerves were dissected together since both structures hold the bulbs against the ethmoidal cribriform plate.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Ab/Lectin*	1st Ab species/dilution	1st Ab Catalogue number	2nd Ab species/dilution (Catalogue number)
Anti-Gαo	Rabbit 1:100	MBL 551	ImmPRESS VR HRP Anti-Rabbit IgG Reagent MP-6401-15
Anti-Gαi2	Rabbit 1:100	Sta Cruz Biotechnology SC-7276	ImmPRESS VR HRP Anti-Rabbit IgG Reagent MP-6401-15
Anti-OMP	Goat 1:400	Wako S44-10001	Horse 1:250 Vector BA-9500
Anti-MAP2	Mouse 1:200	Sigma M4403	ImmPRESS VR HRP Anti-Mouse IgG Reagent MP-6402-15
Anti-GAP43	Mouse 1:800	Sigma G9264	ImmPRESS VR HRP Anti-Mouse IgG Reagent MP-6402-15
Anti-GFAP	Rabbit 1:400	Dako Z0334	ImmPRESS VR HRP Anti-Rabbit IgG Reagent MP-6401-15
Anti-Calbindin	Rabbit 1:5000	Swant CB38	ImmPRESS VR HRP Anti-Rabbit IgG Reagent MP-6401-15
Anti-Calretinin	Rabbit 1:5000	Swant 7697	ImmPRESS VR HRP Anti-Rabbit IgG Reagent MP-6401-15
Anti-LHRH	Rabbit 1:500	Fisher Scientific A235481	ImmPRESS VR HRP Anti-Rabbit IgG Reagent MP-6401-15
UEA-I*	1:10	Vector L-1060	Rabbit 1:50 DAKO P289
LEA*	20 µg/ml	Vector B-1175	Vectastain ABC reagent PK-4000
BSI-B_4*	100 µg/ml	Sigma L-2140	Vectastain ABC reagent PK-4000

Table 1. Antibodies and lectins used, with species of elaboration, dilution, manufacturer, and catalogue number. *Abbreviations* Gαo: Subunit αo of G protein; Gαi2: Subunit αi2 of G protein; OMP: olfactory marker protein; MAP-2: microtubule associated protein-2; GAP-43: growth-associated protein 43; GFAP: glial fibrillary acidic protein; CB: calbindin; CR: calretinin; LHRH: luteinizing hormone-releasing hormone; UEA: *Ulex europaeus* agglutinin; LEA: *Lycopersicum esculentum* agglutinin; BSI-B_4: *Bandeiraea simplicifolia* isolectin B_4; HRP: horseradish peroxidase; IgG: Immunoglobulin G; ABC: avidin–biotin-complex.

Sample processing for histological study. Paraffin embedding was used to perform the histological processing of all samples (VNOs and OBs). In one of the individuals, the complete NC was pre-decalcified; it was immersed in a decalcifying solution (Shandon TBD-1 Decalcifier, Thermo, Pittsburgh, PA, USA) and continuously stirred for thirty hours. The samples were then washed under running water for two hours, and were cut into several blocks which were serially cut from the incisor papilla to the caudal end of the vomeronasal cartilage in order to obtain information on the changes in the VNO throughout its length. Following this process, all blocks were paraffin embedded.

Cutting The samples were cut with a Leica Reichert Jung microtome with a thickness of 4–8 µm, depending on the tissue to be processed. We opted for thinner cuts in the study of the VNO and thicker cuts in the study of the AOB, as these allow a better visualisation of the nerve and glial processes.

General histological staining. In order to highlight the different tissue components, we used the following stainings: Haematoxylin–Eosin (HE) as a general staining, periodic acid-Schiff (PAS) and Alcian Blue (AB) for neutral and acid mucopolysaccharides, respectively, and Nissl staining for the brain tissue. Additionally, two specific stainings, Gallego's Trichrome and Tolivia, were performed.

Gallego's trichrome This stain allows for the differentiation of components of the connective tissue. In non-decalcified samples, it stains erythrocytes green, muscle fibres and collagen light blue, epithelium and glandular tissue red, bone dark blue and cartilage purple. In decalcified samples, the pattern varies slightly; the glandular tissue appears light blue, the muscle fibres and the epithelia are stained green[29]. The protocol used was as follows: sections were deparaffinised and rehydrated to stain with Ziehl acetic fuchsin for 2 min (10 drops Ziehl fuchsin, 1 drop acetic acid, 10 cc distilled water). After washing them with distilled water, they were introduced into formalin–acetic acid solution for 5 min (2 drops formalin, 2 drops glacial acetic acid, 10 cc distilled water). After two more washes, the sections were finally introduced into picroindigocarmine for 3–5 min (one part 1% indigocarmine aqueous solution, two parts saturated aqueous picric acid solution).

Tolivia This technique stains the myelinated nerve fibres a black colour and the neuronal somas a pink colour. To favour the fixing of the dyes, the sections were introduced into 2.5% $FeNH_4(SO4)_2$ for 1 h. The myelin stain solution was prepared freshly as follows: 5 ml of 20% haematoxylin plus 10 ml of 1% Li_2CO_3 in 50 ml of 50% ethanol. The samples were in this solution for 2.5 h. After three washes in tap water for 5 min, the slides were bathed for 5 min in a solution of 0.2% pyronine in 20% formaldehyde. Finally, the samples were dehydrated, cleared and mounted[30].

Histochemical and immunohistochemical staining. *Histochemical labelling (HQ) with lectins* This technique is based on the binding between certain proteins (lectins) and carbohydrates, which can be found free, in oligosaccharides or in glycoproteins. For our study, we used (1) a lectin that comes from the gorse, the *Ulex europaeus* agglutinin (UEA), which recognises α-L-fucose, (2) the α-galactose-specific BSI-B_4 that comes from *Bandeiraea simplicifolia*, and (3) *Lycopersicon esculentum* agglutinin (LEA), a lectin coming from tomato with a high affinity for N-acetyl-β-D-glucosamine oligomers (Table 1). These stains selectively recognise the different components of the olfactory and vomeronasal pathways in some species. They have been used in both VNO and AOB sections.

The protocol for the UEA is as follows. It begins by (i) blocking the endogenous peroxidase activity of the sample, avoiding possible interference with the developing solution. To do this, the sample is incubated in 3% H_2O_2 solution for 10 min and then (ii) incubated for 30 min in 2% bovine serum albumin (BSA), which prevents

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

nonspecific binding. The next step is (iii) incubation with the UEA lectin for 1 h to visualise the lectin-carbohydrate junction followed by (iv) 3 × 5 min washes in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.2), and (v) incubating for 12 h in a peroxidase-conjugated immunoglobulin against the UEA. Finally, (vi) the sections were washed with PB and developed by (vii) incubation of the sections in a solution of 0.05% diaminobenzidine (DAB) and 0.003% H_2O_2 for 5 min.

The protocol for the LEA and BSI-B_4 begins with the same two steps. Next, we (iii) incubated the sections overnight in biotinylated lectins diluted in 0.5% BSA. The next day, the samples were (iv) incubated for 1.5 h in Vectastain ABC reagent (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). The samples were finally (v) developed by incubation in the same DAB solution as the UEA.

Immunohistochemistry (IHQ) techniques After deparaffinisation and rehydration, this protocol also began by (i) blocking the activity of endogenous peroxidase. Later, (ii) the non-specific binding was blocked with 2.5% horse normal serum from the ImmPRESS reagent kit Anti-mouse IgG/Anti-rabbit IgG (Vector Laboratories, CA, USA) for 30 min. (iii) The primary antibody was then added at the corresponding dilution (Table 1) and allowed to incubate overnight. The next day, (iv) the samples were incubated for 20 min with the corresponding ImmPRESS VR Polymer HRP Anti-Rabbit IgG Reagent. (v) After rinsing in Tris-buffer (pH 7.61) for 10 min, (vi) the samples were finally developed using DAB as a chromogen in the same way as for the lectins.

All immunohistochemical protocols were checked with the appropriate controls. In the absence of a positive control specific to capybaras, we replicated the entire histochemical procedure with mouse tissues known to express the proteins of interest. Samples for which the primary antibody was omitted were used as negative controls.

Acquisition of images and digital treatment. Digital images were taken using the Karl Zeiss Axiocam MRc5 digital camera coupled to a Zeiss Axiophot microscope. Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA) was used as needed to adjust parameters such as brightness or contrast, balance light levels, and crop or resize images for presentation in this work. Some photomicrographs were formed as a mosaic of several photographs merged with an image-stitching software (PTGui Pro, New House Internet Services BV, The Netherlands).

Ethical approval. All the animals employed in this study dead by natural causes.

Informed consent. No human subject was used in this study.

Results

The main macroscopic features of the capybara VNO are depicted in Figs. 1,2. A series of cross sections were made along the previously decalcified nasal cavity (Fig. 1). By this method, we identified the organ located in the central levels where the cavity is T-shaped and dorsally occupied by the turbinates (Fig. 1A). Ventrally, a recess, formed by the presence of the roots of the incisors, is occupied by the prominent dorsal projection of the palatine process of the incisive bone (Pp), on which both VNOs rest.

The VNO was dissected in the other two heads. After removing the roof, side walls and floor of the nasal cavity, there were no recognisable landmarks of the organ, which is hidden under a triangular elevation in the mucosa (Fig. 2C). A transverse section confirmed the identity of the organ (Fig. 2B). The opening of the VNO was not visualised macroscopically, but the dorsal location of the organ suggested that it communicates directly to the nasal cavity, and not with the incisive duct (ID) as in some other non-rodent species. This was subsequently confirmed by serial histological sections. The incisive duct communicates the oral cavity with the nasal cavity through the incisive papilla. The presence of a wide palatine fissure in the skull allows this communication (Fig. 2E,F).

The brain was removed to appreciate the degree of development and the topography of the olfactory portion, mainly formed by the OBs, the lateral olfactory tract and the piriform lobes (Fig. 3B). The main olfactory bulbs (MOB) were then sectioned at the peduncle level and the anterior frontal lobe was removed to visualise the AOB more easily. It corresponded to an oval elevation in the dorsocaudal area of the OB (Fig. 3A,C). This was delimited by blood vessels and the arrival of the vomeronasal nerve through its medial face was visualised.

The VNO in the newborn capybaras (P0) presents a capsule, a vomeronasal duct and the parenchyma.

Capsule Well-developed, it completely envelopes the organ in its central part (Fig. 4A–C). Anteriorly, related to the opening of the vomeronasal duct, the lateral part of the capsule is absent (Fig. 4B). Caudally, it presents a dorsal groove for the exit of the nerves (Fig. 5B). The capsule is cartilaginous in nature but, in the caudal third it is progressively replaced from ventrodorsally by a bone capsule, which is noticeable in the adult skull (Fig. 2A,D). Ventrally, this bone capsule is an extension of the maxillary bone, and dorsally it is completed by the vomer bone (Fig. 5A,B).

Vomeronasal duct The duct is semicircular in section and is laterally covered by a respiratory epithelium and medially by a neuroreceptor epithelium, which in comparison has a significantly higher degree of development than the former (Fig. 5C–G). In the medial epithelium, three cell strata are distinguished: the sustentacular cell layer (SC) in the apical part, the neuroreceptor cell layer (NC) in the centre, and the basal cell layer (BC). The duct opens into the nasal cavity directly at its most anterior end through a small hole only visible in the histological series (Fig. 4B). Ventrally, the vomeronasal duct is related to the incisive duct (Fig. 4C). The ID ends in the incisive papilla, communicating in this way both the nasal and oral cavities. Additionally, the ID presents a cartilaginous envelope that prevents its collapse (Fig. 4D).

Parenchyma Its main components are vessels (mostly veins and sinuses), nerves, glands and loose connective tissue. The axons of the neuroreceptor cells converge, forming nerve fascicles (Fig. 6A) in the dorsomedial part of the parenchyma. They leave the parenchyma through the dorsal fissure of the capsule (Fig. 5B). At higher

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

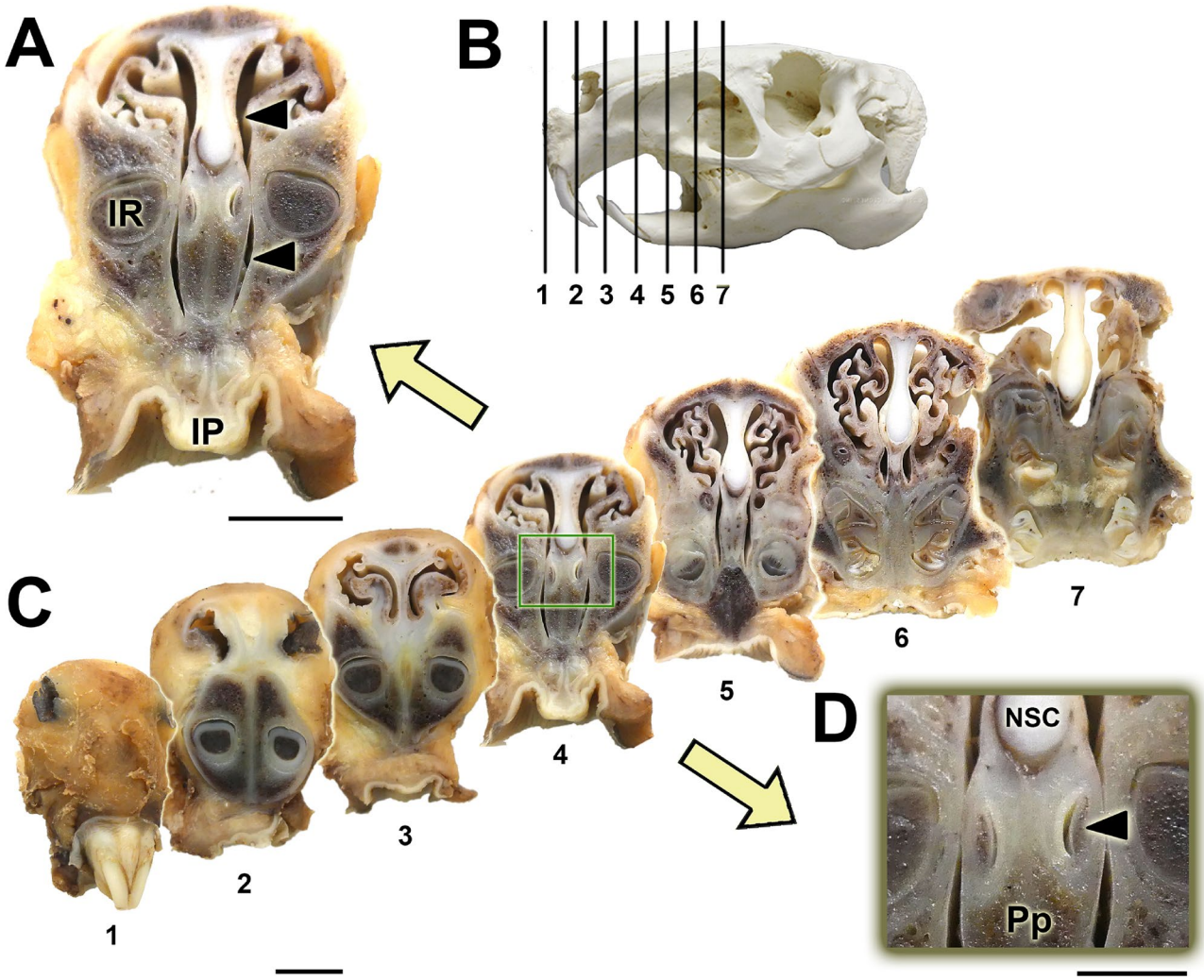

Figure 1. Cross sections of the nasal cavity in seven levels (**C**) ordered from rostral (1) to caudal (7). The levels of the sections are represented in the lateral view of the skull (**B**). The central part of the VNO is located at level 4 and can be seen at greater magnification in (**A**). In the same image, we can see the incisive papilla (IP) and the roots of the incisors (IR). At higher magnifications (**D**) two slits are observed that correspond to the vomeronasal ducts, associated with their cartilaginous capsule (arrow). Both organs are located in the central part of the nasal septum, dorsal to the incisive bone (Pp) and ventral to the cartilage of the nasal septum (NSC). Scale bars: (**A**,**C**) 1 cm; (**D**) 0.5 cm.

magnifications, individual nucleated cells can be seen leaving the sensory epithelium (SE) towards the nerve bundles, constituting a striking migratory stream (Fig. 6B–E). They are immunolabelled with anti-GAP-43 (Fig. 6A,C), whereas the labelling with anti-LHRH gave a negative result. The vasculature of the organ is poorly developed, presenting veins of moderate calibre and arteries of small calibre, which only become evident in the caudal zone, suggesting that the erectile character of the parenchyma is moderate (Fig. 5F). The vomeronasal glands, acinar, tubular or tubuloacinar, concentrated in the dorsal area (Fig. 5D). Caudally, the ends of the organs present a greater development of the glandular component (Fig. 5B). The morphology of the acini corresponds to the serous type, and its secretion is AB positive and very weakly PAS positive (Fig. 5A,D).

The microscopic study of the AOB confirms its dorsocaudal location with respect to the MOB (Fig. 3C). Through sagittal sections, the characteristic laminar structure of the AOB is identified, differentiating the following strata: nervous, glomerular, external plexiform with a high degree of development, internal plexiform, a layer comprising numerous mitral cells between both plexiform layers named as mitral cell layer, and a deeper granular layer (Fig. 7A,B). The horizontal sections provide more information about the topography of the AOB and, in them, the arrival of the vomeronasal nerve can be seen through the medial surface of the OB (Fig. 7D). Tolivia staining allows the identification of abundant black myelinated fibres in the AOB granular stratum that converge in the LOT. In this staining, the mitral cells are stained red and show their polyhedric structure (Fig. 7C). The glomeruli in the AOB are smaller and less numerous than those in the MOB (Fig. 7E,F).

Lectin histochemical and immunohistochemical study. Both the UEA and the LEA lectins produce an intense label in the sensory epithelium (SE) of the VNO but are negative in the respiratory epithelium (RE)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

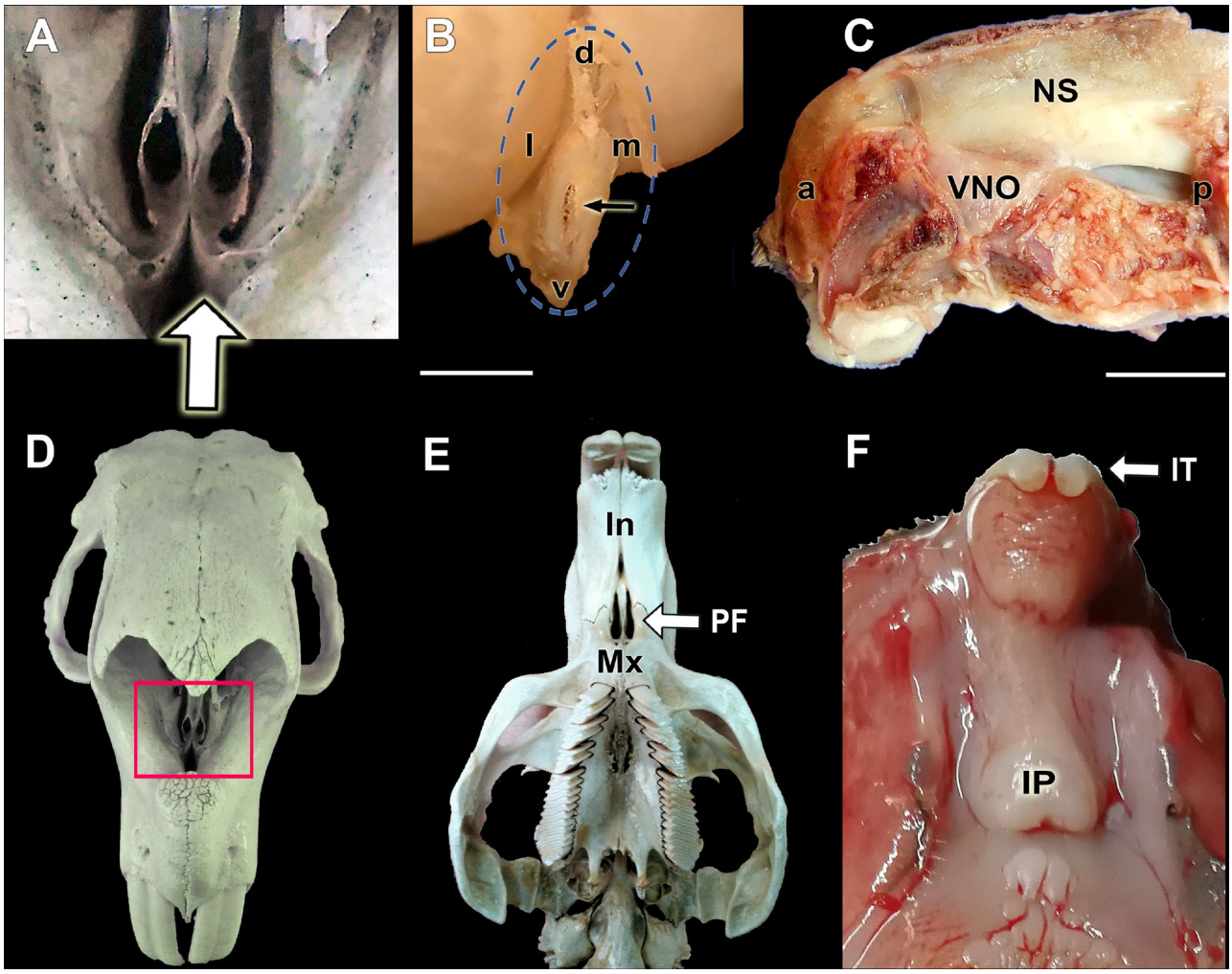

Figure 2. Dissection of the VNO and the incisive papilla. (**A**–**D**) The adult capybara skull gives us the first information on the topographic features of the VNO. (**D**) The dorsorostral view of the skull shows the bony structures that support the caudal third of both organs. The inset is shown in (**A**). (**B**) VNO cross section after its extraction, bounded by the blue circle. Arrow: VNO capsule. (**C**) Dissection of the deep plane of the left nasal cavity. The VNO corresponds to the triangular area in the anteroventral part of the nasal cavity. (**E**) Ventral view of an adult capybara skull showing the palatine fissures (PF). (**F**) Roof of the oral cavity of the neonate capybara showing the incisive papilla (IP). a: Anterior, p: posterior, d: dorsal, l: lateral, m: medial, v: ventral; In: Incisive bone; IT: Incisor teeth; Mx: Maxillary bone; NS: Nasal septum. Scale bars: (**B**) 2 mm; (**C**) 1 cm.

(Fig. 8A,G). The UEA lectin labels all of the cells, but the LEA lectin only labels a portion of the cell population (Fig. 8D,J). The vomeronasal nerves (VNNs) and the vomeronasal glands (VNGs) are also positive with both markers. Anti-Gαo and anti- Gαi2 produce immunolabelling in both the SE and in the VNN, (Fig. 8B,C,E,F). Calbindin and calretinin markers label the SE and the VNNs (Fig. 8H–I, K,L).

In the AOB, the anti-Gαi2 and anti-Gαo immunohistochemical labellings followed an intense and complementary pattern. The first sharply marks the nervous and glomerular layers in the anterior area of the AOB. The anti-Gαo immunostains the same layers in the posterior area of the AOB as well as the rest of nervous tissue (Fig. 9A,B). Immunolabelling with anti-GFAP produces a more prominent diffuse pattern in the nervous and glomerular part of the AOB. It allows identification of the ensheathing glia of the nervous layer of the AOB, and a significant number of astrocytes (Fig. 9C,D). Calbindin and calretinin produce a complete labelling of the AOB without discriminating a zonation and specifically, CR revealed immunopositive mitral cell bodies (Fig. 9E,G). Anti-MAP-2 labelling focused on both the external plexiform and glomerular layers, but the latter is labelled with less intensity (Fig. 9FH). The anti-OMP was strongly positive in the MOB, but in the AOB only marked the glomerular layer (Fig. 9I·J).

UEA lectin is positive in the nervous and glomerular strata of both the AOB and MOB. In the AOB, it produces a more intense marking in the anterior area (Fig. 10A–C). The LEA lectin completely marks the AOB without differentiating zones (Fig. 10D). Finally, the lectin BSI-B_4 staining did not result in positive labelling, in either the VNO or the AOB.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

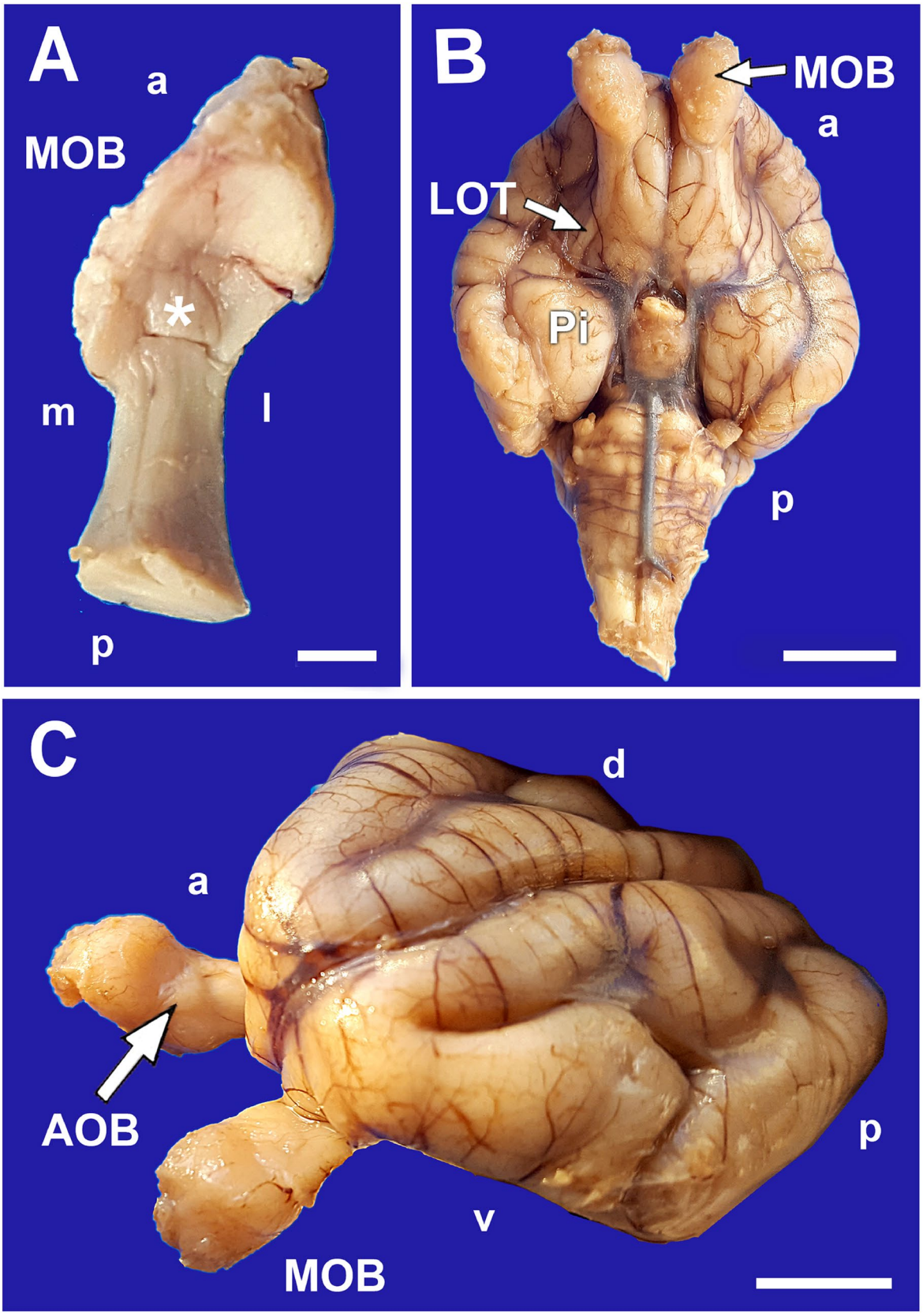

Figure 3. Olfactory bulbs of the neonate capybara. (**A**) Dorsal view of the right olfactory bulb showing the location of the AOB (asterisk). **(B)** Ventral view of the brain showing the topography of the olfactory pathway. MOB: Main olfactory bulb; LOT: Lateral olfactory tract; Pi: Piriform lobe. **(C)** Rostrolateral view of the brain where the MOB and the AOB (arrow) are differentiated. a: Anterior; p: posterior; d: dorsal; v: ventral. Scale bars: (**A**) 2.5 mm; (**B**,**C**) 1 cm.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

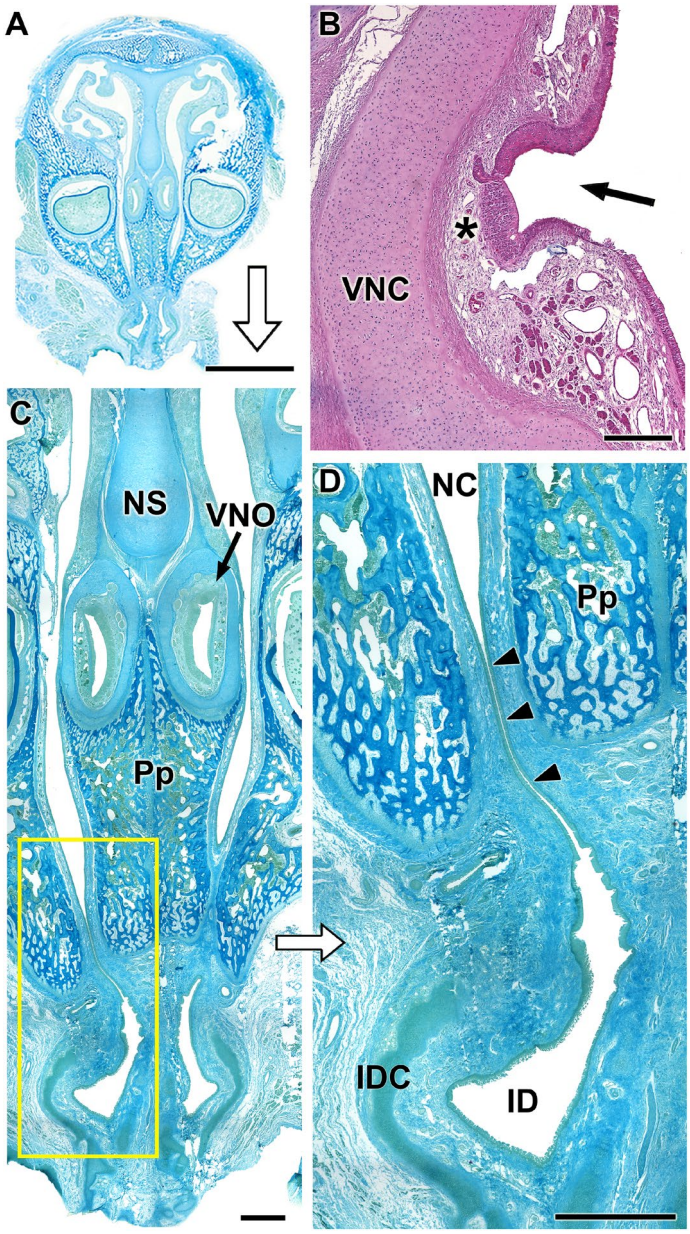

Figure 4. Histological images of the whole nasal cavity of the P0 capybara showing the topographical relationships of the VNO. (**A**,**C**,**D**) Successive magnifications showing the location of the VNO and the communication (arrowheads) established between the nasal and oral cavities through the incisive duct (ID). **(B)** Mouth of the vomeronasal duct in the nasal cavity (arrow). At this level, the receptor epithelium (asterisk) is already present. IDC: Incisive duct cartilage; NC: Nasal cavity; NS: Nasal septum; Pp: Palatal process of the incisive bone; VNC: Vomeronasal cartilage; VNO: Vomeronasal organ. Stainings: (**A**,**C**,**D**) Gallego's trichrome; (**B**) Hematoxylin–Eosin. Scale bars: (**A**) 1 cm; (**B**) 250 µm; (**C**, **D**) 1 mm.

Discussion

There are significant structural, phylogenetic, and species-specific variations of the VNS between species[31]. Relative to the olfactory system, the VNS has at genomic level a greater diversity[4]. Comparative sequence analyses have demonstrated that MOE receptor gene sequences are well-conserved, whereas VNO receptors are associated with a wide variety of genes, suggesting a more dynamic evolution[32]. However, we must not forget that relationships between these systems reflect their common history of ecological adaptations during evolution[12]. In addition, pheromones are, by definition, specific for each species, and different species have different behavioural and reproductive strategies[33,34]. Given this huge diversity more morphofunctional studies of the VNS are needed to understand the basis of this genetic and behavioural multiplicity.

Currently, the most studied and representative VNS models among mammals are the mouse and the rat—species in which the VNS presents great morphofunctional development. However, these species comprise only a

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

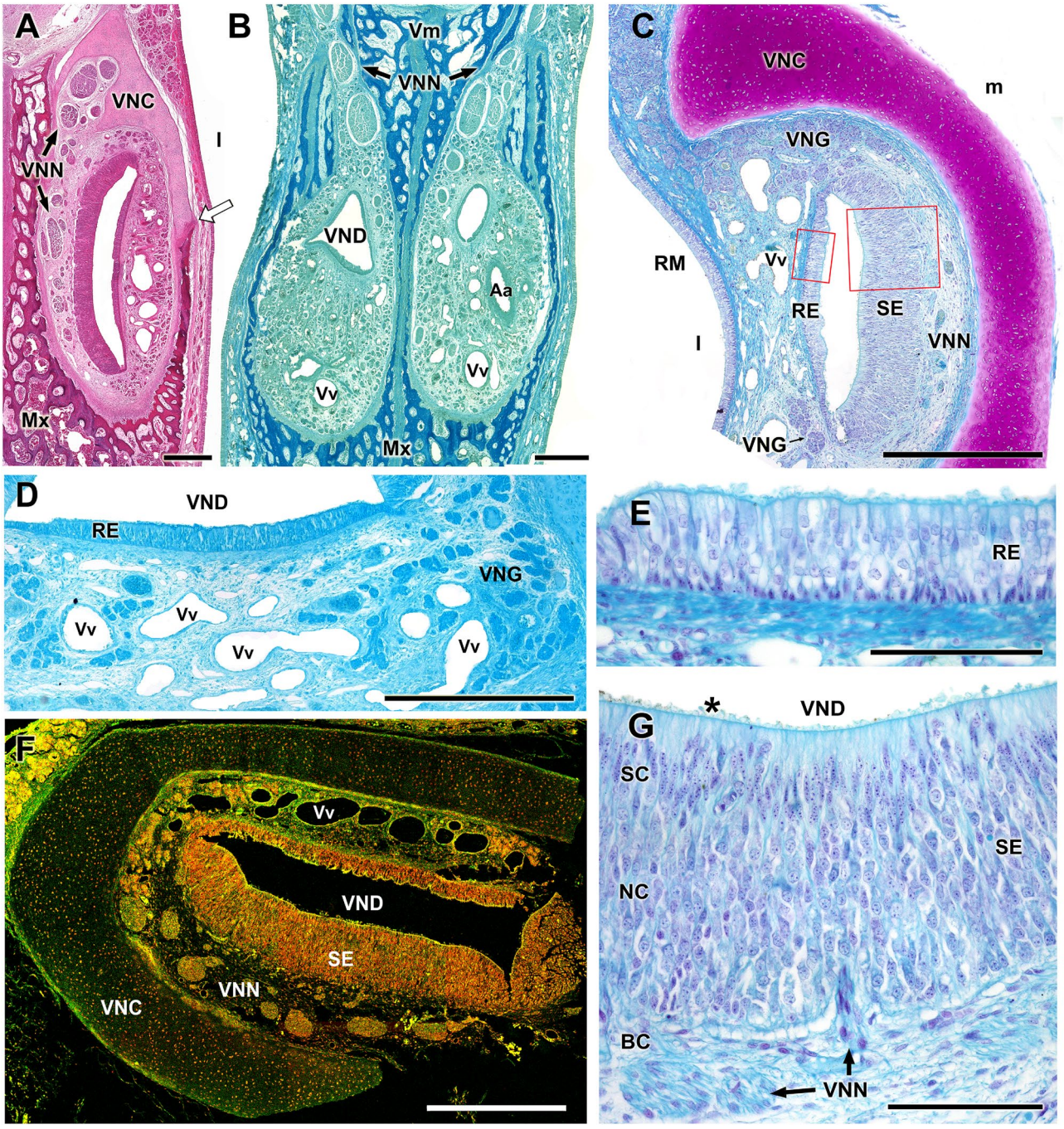

Figure 5. Histological sections of the capybara VNO showing its main components. (**A**,**B**) Transverse sections of the nasal septum exposing the nature of the vomeronasal capsule. **(A)** corresponds to the central level, where the cartilage is replaced ventrally by the dorsal projection of the maxillary bone (white arrow). **(B)** corresponds to a caudal level where the bone capsule fully encapsulates both VNOs. **(C)** Cross section of the VNO showing the main components in the parenchyma: Vomeronasal duct (VND) lined medially by sensory epithelium (SE) and laterally by respiratory epithelium (RE), vomeronasal glands (VNG), vomeronasal nerves (VNN), vomeronasal cartilage (VNC) and veins (Vv). Both epithelia, RE and SE, insets are magnified in figures **(E)** and **(G)** respectively. In the SE, the three cellular strata can be seen: SC, sustentacular cells; NC, neuroreceptor cells; and BC, basal cells. The microvilli (asterisk) contact with the lumen of the vomeronasal duct. **(D)** Enlargement of the dorsolateral area of the VNO showing the serous and AB + nature of the vomeronasal glands. **(F)** Study of the VNO irrigation by confocal microscopy showing veins along the lateral part of parenchyma. Elastin autofluorescence of a transversal section. Nuclear counterstaining with TO-PRO-3. Aa: Artery; Mx: Maxillary bone; MR: Respiratory mucosa of the nasal cavity: Vm: Vomer bone; l: lateral; m: medial. Stainings: (**A**) Hematoxylin–Eosin; (**B**,**C**,**E**,**G**) Gallego's trichrome; (**D**) Alcian blue. Scale bars: (**A**–**D**) 500 µm; (**E**–**G**) 100 µm.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

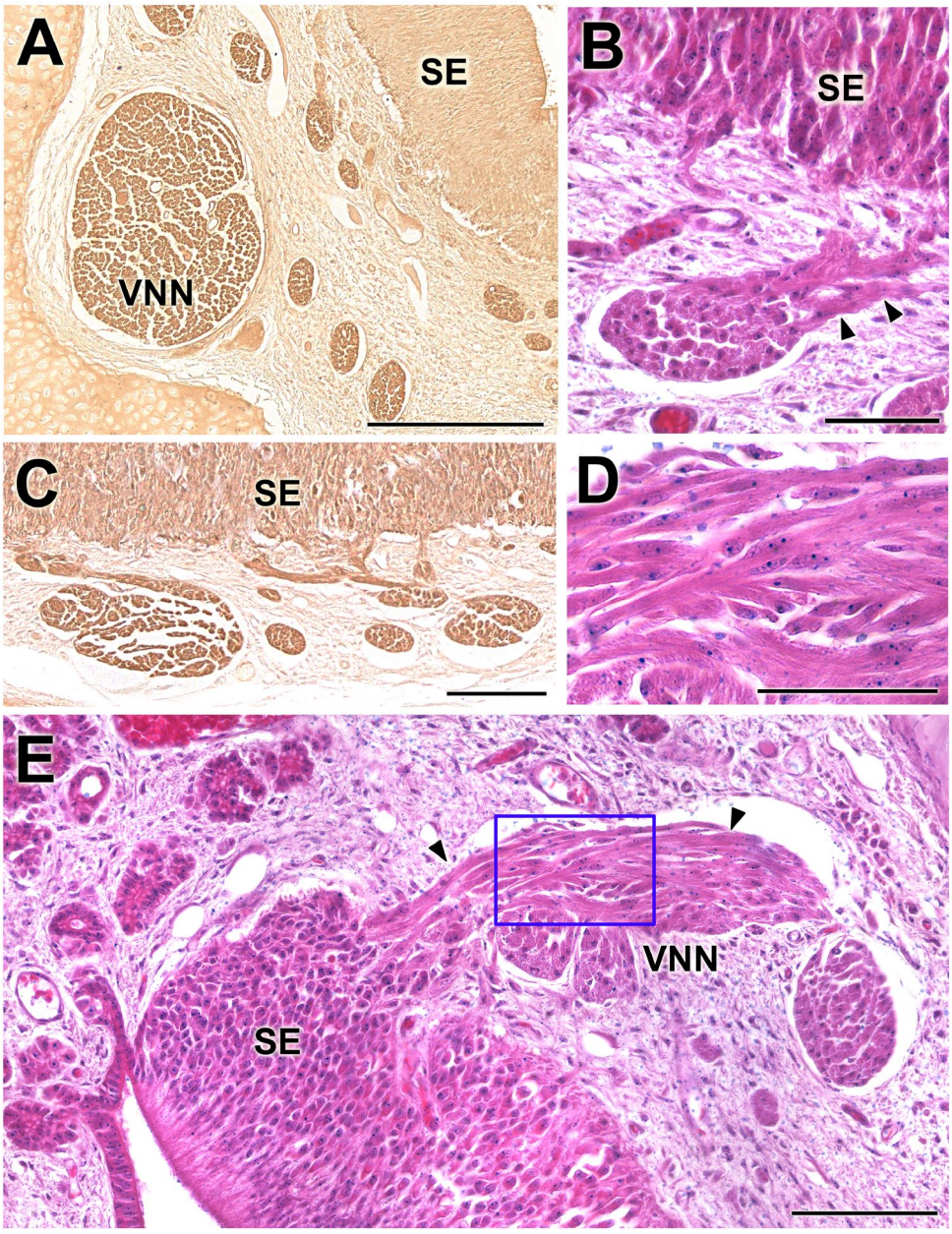

Figure 6. Histological study of the capybara vomeronasal nerves (VNN). (**A**,**C**) Large branches of the VNN in the dorsomedial (**A**) and medial (**C**) areas of the VNO immunostained by anti-GAP43. **(B**,**E)** Migratory stream of cells departing from the sensory epithelium (arrowheads). **(D)** Higher magnification of the inset showed in **E**. Stainings: (**B**,**D**,**E**) Hematoxylin–eosin. SE: sensory epithelium; VNN: Vomeronasal nerves. Scale bars: (**A**) 250 µm; (**B**,**D**) 50 µm; (**C**,**E**) 100 µm.

small fraction of the Rodentia family; therefore, we opted to study another rodent, the capybara, to determine whether the VNS of the mouse and rat are representative of the entire rodent family or whether significant differences exist in other species. Moreover, most studied rodents derive from laboratory strains, that omit natural conditions[35]. Studying a rodent species that has not undergone artificial selection by humans was another goal of this study. Finally, because the capybara is a precocial species, the use of newborn individuals allowed us to determine whether and how the VNS morphology had adapted to the requirements of a challenging environment, at birth.

Although valuable information on the expression of G proteins in the AOB of the adult capybara is available[23], we have expanded these observations, addressing the main morphological and neurochemical features of both the AOB and the VNO. Our immunohistochemical study paid as well special attention to G proteins because new information on their perinatal expression could be relevant to understanding the role of the VNS at this stage of life. Adult capybara express the two families of vomeronasal receptors, V1R and V2R, which can be identified

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

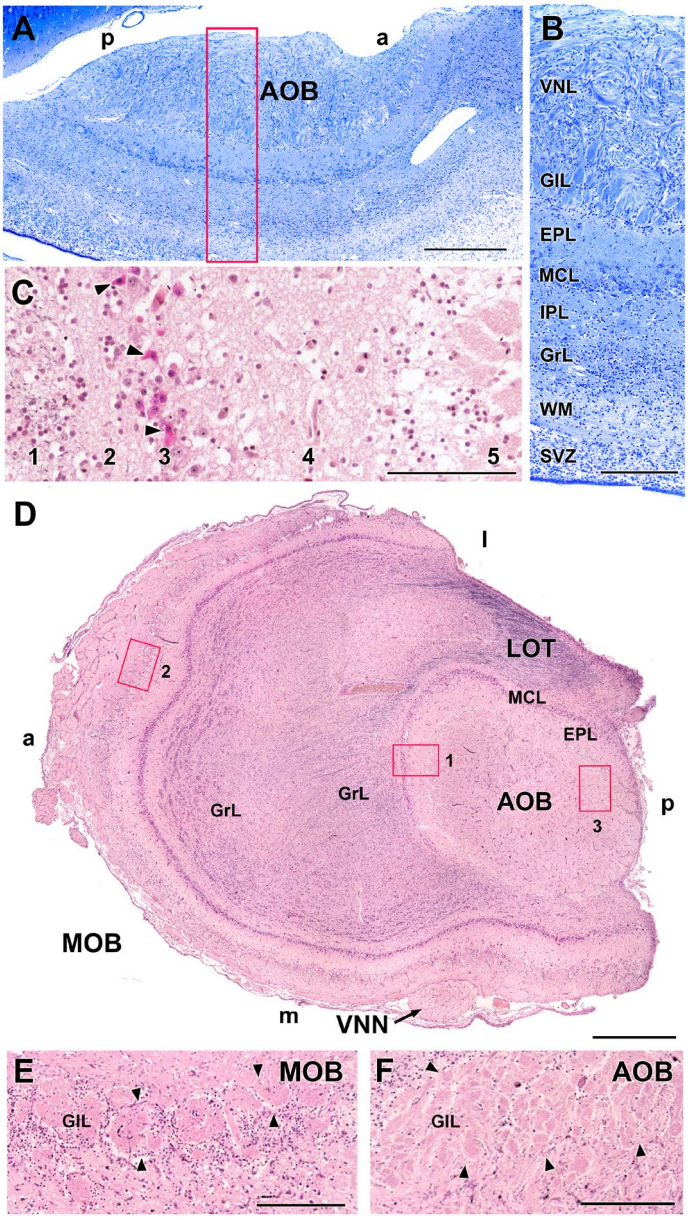

Figure 7. Capybara AOB microscopic study. (**A**) Sagittal section stained by Nissl. The laminar organisation is visible and showed at higher magnifications in **(B)**: Inset from (**A**) Vomeronasal nervous layer (VNL), glomerular layer (GlL), external plexiform layer (EPL), mitral cell layer (MCL), internal plexiform layer (IPL), granular cell layer (GCL), white matter (WM) and subventricular zone (SVZ). **(C)** Higher magnification of the inset 1 in (D). The Tolivia staining shows the polyhedric morphology of mitral cells (arrowheads). (1) GCL; (2) IPL; (3) MCL; (4) EPL; (5) GlL. **(D)** Horizontal section of the complete olfactory bulb stained with Tolivia to identify the convergence of myelinic fibres in the lateral olfactory tract (LOT). The differences in size and lamination of MOB and AOB and the arrival of the vomeronasal nerve (VNN) from the medial side of the olfactory bulb are noticeable. **(E)** Higher magnification of the inset 2 in (D) showing the GlL of the MOB **(F)** Higher magnification of the inset 3 in (**D**) showing the GlL of the AOB. a: Anterior; p: posterior; l: lateral; m: medial. Scale bars: (**A**) 500 µm; (**B**,**C**,**E**,**F**) 250 µm; (**D**) 1 mm.

immunohistochemically by studying G protein expression[23], as V1R neuroreceptor cells specifically possess the αi2 subunit of the G proteins in their sensory transduction chain, whereas V2R cells express the αo subunit.

As G proteins play a critical role in the pheromonal signal transduction chain, their immunopositivity along the neuroepithelium of the VNO, the VNN, and the nervous and glomerular layers of the P0 capybara AOB points to the existence of full maturity of the VNS in the newborn capybara (Fig. 8E,F). This fact is consistent with the high degree of maturity of the offspring at birth[36]. A comparable pattern of early prenatal development has been found in the VNS of other precocial mammals such as pigs[37] and sheep[38], although in neither case was the expression of G proteins in the VNS evaluated. The expression of G proteins observed in the AOB of the newborn capybara (Fig. 9A,B) establish a clear anteroposterior zonation, identical to that observed in the adult

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

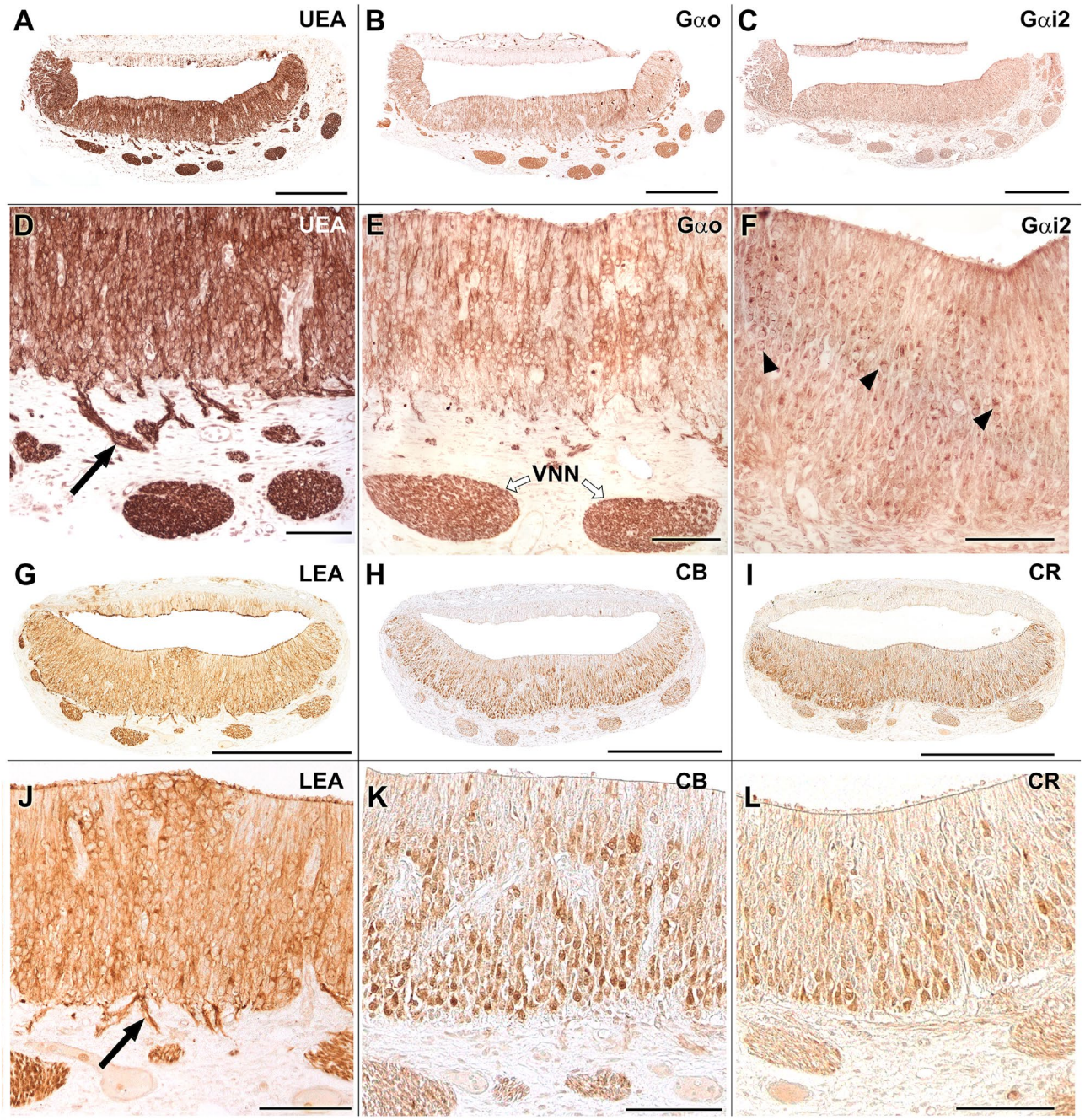

Figure 8. Capybara VNO histochemical and immunohistochemical labelling. (**A**,**D**) UEA lectin strongly marks both the entire sensory epithelium and vomeronasal nerves. It also allows the identification of the migratory current (arrow). **(B,E)** IHC labelling with anti-Gαo stains the vomeronasal nerves (white arrows) and produces a focally diffuse pattern in the neuroepithelium. **(C,F)** IHC labelling with anti-Gαi2 stains the nerve component and marks isolated receptor cells (arrowheads). **(G,J)** The LEA lectin produces a label similar to the UEA lectin, but not as thoroughly. A major part of the sensory epithelium and the vomeronasal nerves are marked. Migration is also identified (arrow). **(H,K)** Anti-Calbindin (CB) produces a cellular labelling distributed in the central and basal areas of the epithelium. **(I,L)** Anti-Calretinin (CR) produces a cellular labelling mainly concentrated in the basal area of the epithelium. Scale bars: (**A**–**C**, **G**–**I**) 500 µm; (**D**–**F**) 100 µm.

AOB[23]: the Gαi2 protein is expressed in the anterior area of the AOB and the Gαo protein in the posterior area. This zonation is also discriminated by the UEA lectin (Fig. 10C), which stained the anterior part more intensely. This pattern coincides with that observed in mice[15,39]. However, a later exhaustive study of UEA labelling in the mouse olfactory system[40] could only identify such AOB zonation in 3 of the 16 mice studied. The authors concluded that these individual differences may be caused by the presence or absence of cues that activate receptor cells or may reflect the differences between wild and laboratory rodents. The presence of the UEA anteroposterior

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

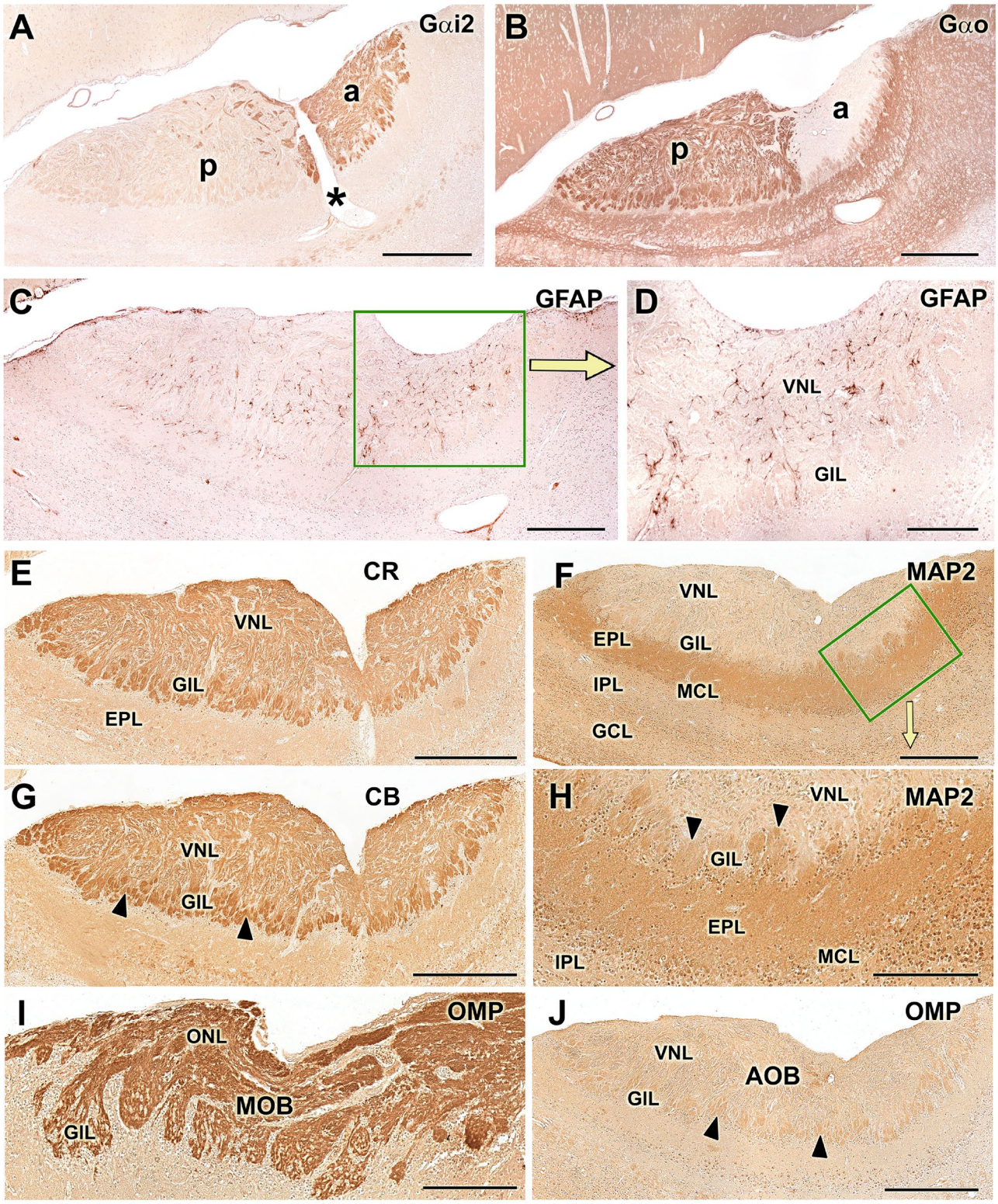

Figure 9. Immunohistochemical labelling in the capybara AOB. (**A**) The IHC labelling with anti-Gαi2 stains the nervous and glomerular layers of the anterior area of the AOB. **(B)** On the other hand, the anti-Gαo marks all of the nervous tissue except the anterior part of the AOB, resulting in a complementary expression pattern of both G proteins. **(C,D)** Marking with anti-GFAP produces a more prominent diffuse pattern in the nervous and glomerular part of the AOB. **(E,G)** In the AOB, both anti-Calretinin (CR) and anti-Calbindin (CB) produce a complete label more intense in the glomerular layer (arrowheads). **(F,H)** MAP2 labelling focuses on the external plexiform and in the glomerular layers (arrowheads). **(I,J)** The anti-OMP is immunopositive in the MOB, marking intensely the nervous and glomerular layers (GlL) whereas in the AOB the labelling is very faint, except in the GlL (arrowheads). a: Anterior; p: posterior. Scale bars: (**A**–**C**,**E**–**G** and **J**) 500 µm; (**D**,**H** and **I**) 250 µm.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

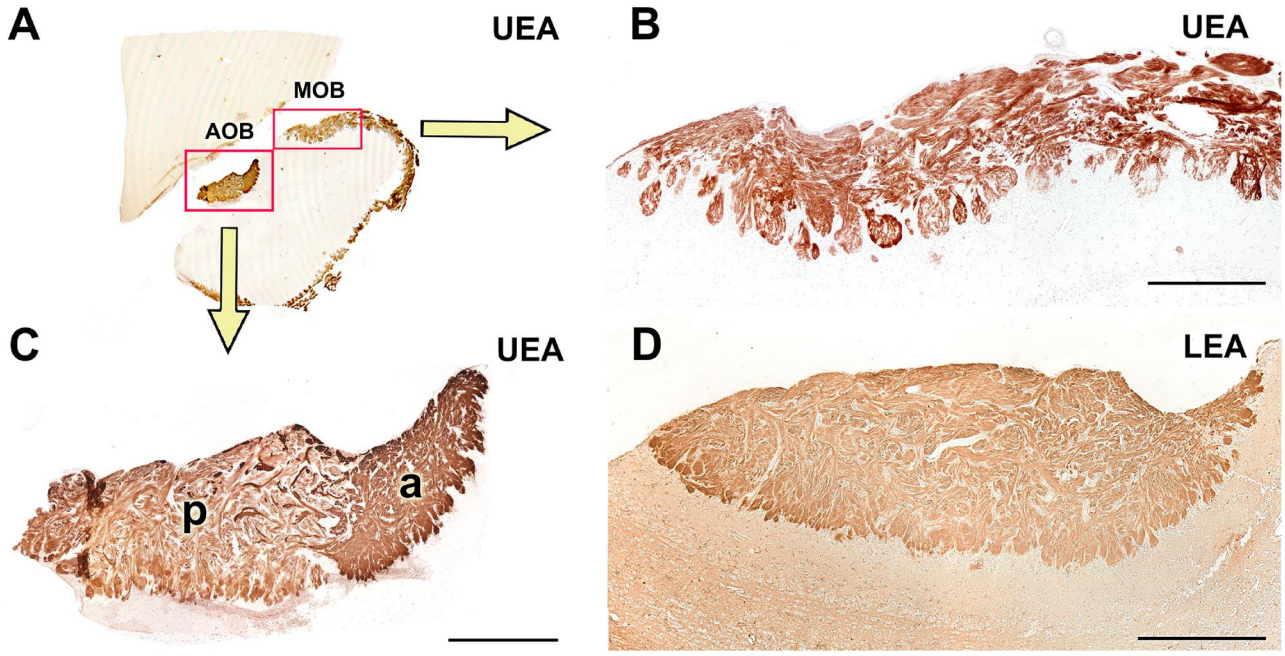

Figure 10. Lectin histochemical labelling in the capybara AOB. (**A**–**C**) UEA lectin is positive in both the nervous and glomerular strata of the entire olfactory bulb. In the AOB, it produces a slightly more intense labelling in the anterior area. **(D)** LEA lectin is positive in the entire AOB without differentiating zones. a: Anterior; p: posterior. Scale bars: (**B**) 250 µm; (**C**,**D**) 500 µm.

zonation in the capybara appears to confirm this theory regarding the differences between wild and laboratory animals. LEA lectin (Fig. 10D) stained equally both zones, being an useful marker of both olfactory systems.

Although the small number of available individuals available prevented the realization of a rigorous statistical study, all of our newborn specimens showed a caudal portion that was larger than the rostral portion, which demonstrated that starting at the perinatal stage, the capybara shows the bias toward a more prominent caudal AOB that was previously described in adult individuals by Suarez et al.[23,41] These results, combined with the recent observations regarding the morphometrical parameters of the AOB, in two closely related degus species with contrasting social habits[20], invite the hypothesis that some structural features of the AOB reflect the species lifestyle and arise during an early stage of the ontogeny.

We undertook further immunohistochemical and morphological studies that confirmed the functionality of the VNO and AOB at this early stage. In the VNO, the calcium-binding-proteins, calretinin and calbindin markers (Fig. 8K·L) stained the parenchymal nerve bundles and almost all of the sensory neuroepithelial cells, although they labelled different cell populations. Something similar happens in the shrew, where calretinin produces an intense labelling in almost all receptor cells and in the VNNs in prenatal individuals[42]. Both markers produced a similar labelling on the AOB, labelling the VNL and GlL layers, although the second one more intensely. In addition, calretinin produced a labelling of mitral cells as seen in prenatal studies in the shrew[42] and adult hedgehog[43].

The antibody to glial fibrillary acidic protein (Fig. 9C,D) labelled a significant number of astrocytes in the nerve and glomerular layers of the AOB. This fact is striking when compared with other species, since in most studies the astrocytic development at this early stage is hardly noticeable. In the case of the opossum, there is hardly any labelling with GFAP in a P0 individual[44]. Only studies in P0 mice show an astrocytic development close to that of the capybara, but it occurs in the intermediate superficial zone, which corresponds to a primitive stage of the internal plexiform layer. Therefore, the early labelling of astrocytes in P0 capybaras reinforces the idea that it presents a VNS with a high degree of maturity at birth.

Anti-microtubule-associated protein 2 (MAP-2) is an invaluable marker for the dendritic trees of mitral cells[46]. In the AOB of P0 capybara (Fig. 9F-H), the MAP-2 antibody produces diffuse labelling which is consistent with that seen in other species at birth such as rats, mice and opossum[44–48]. Anti-olfactory-marker-protein (OMP) produces an intense pattern of labelling in the nervous and glomerular layers of the MOB, but hardly produces labelling in the AOB, immunostaining only the glomerular layer weakly (Fig. 9I·J). It has been observed in other species that the nerve and glomerular layers of both bulbs are positive for the OMP marker after birth. However, it has also been seen that OMP marking has a considerable difference in the degree of intensity between AOB and MOB, being more intense in the case of MOB. This also happens in rodents such as the mouse or rat[49] or in marsupials such as the opossum[50].

In addition to this neurochemical findings, our study in the P0 capybara has provided evidence for certain morphological and immunohistochemical features unique to this species—for instance, the nature of the capsule that protects both VNOs, their dorsal location in the nasal cavity over the palatal process of the incisive bone,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

the high degree of morphological differentiation of the AOB at that early stage, and finally the presence of a migratory stream from the neuroepithelium of the VNO to the VNNs.

Macroscopically, the dorsal location of both VNOs is remarkable, as they rest on the palatal process of the incisive bone and not on the vomer bone, as is the case in most species (Figs. 1and 4). This topography is only comparable to that described in rabbits[51], where the organs rest over a prominence of the vomer bone. Two patterns of communication of the vomeronasal duct with the outside have been described. In the first, the vomeronasal duct opens directly into the incisive duct, as is the case in most domestic mammals such as cows, dogs, horses and pigs[52] as well as in lemurs[53]. But in the second, the VNO flows directly to the ventral meatus of the nasal cavity, in its rostral area. The latter is the case for all rodents[54] and lagomorphs[51] studied to date. Accordingly, in the capybara, both vomeronasal ducts open directly into the nasal cavity. Though in most species, the nature of the vomeronasal capsule is exclusively cartilaginous, there are species such as the mouse in which the capsule is formed by a thin bone sheet[39] or doubly composed of cartilage and bone, as in the lagomorphs[51]. In the newborn capybara, we have observed a different pattern thus far unpublished in the literature,the capsule is initially cartilaginous, but from the central area of the organ it is progressively replaced from ventral to dorsal by a bone sheet that ends up completely enveloping the VNO in its caudal area (Figs.2A and 5A,B).

The development and maturity of the receptor neuroepithelium in newborn individuals (Fig. 5E) resembles the highly differentiated epithelium typical of another rodent, the rat[54,55]. The parenchyma presents moderate development of blood vessels (Fig. 5F). In this way, the capybara differs from other species such as cats[56] or rabbits[51], in which the development of the vascular pump is very sophisticated. The vomeronasal pump is the physiological mechanism by which pheromones dissolved in fluids are transported to the vomeronasal duct[57,58].

The secretion of the vomeronasal glands to the duct of the organ plays a very important role in vomeronasal perireceptor processes[59,60]. The newborn capybara VNO shows a significant development of the glandular tissue, especially in the caudal end of the organ (Fig. 5B). However, in the central part of the duct, the presence of glands is more moderate. This pattern is analogous to that found in other rodents such as rats, guinea pigs[61] and mice[62,63]. However, histochemically, their character in the capybara is both PAS + and AB + , which contrasts with that found in most rodents studied, which only express PAS + glandular secretion (rat and guinea pig[64], mouse[62,65], vole[66], hamster[67], chinchilla[16]). This notorious variation in gland characteristics within the same order may reflect an adaptation in capybaras to the aquatic nature of their habitat, which might require a specific pheromone-receptor interaction milieu.

All previous studies on the Rodentia vomeronasal glands (VNG) applying conventional histochemical techniques were done in adult specimens. There is less information regarding the prenatal and perinatal stages. We found in the newborn capybara that the VNGs are reactive to UEA-I, a lectin specific for mucous secretions[68] and to LEA, which has been linked to the presence of sialic acid and galactosamine units in the glands[25,69], and negative for the α-galactose-specific BSI-B_4 lectin. These results agree with those found in newborn mice[39], although in the latter case, the glandular development was less notable. Apart from rodents, precocial mammals show a remarkable prenatal development of the VNG, as Salazar et al.[38] found LEA + glands in sheep foetus in the second trimester of pregnancy and in pig foetus in the fourth week of pregnancy[37,70].

In the parenchyma of the newborn capybara, the VNNs are concentrated in the medial area of the organ, forming nervous fascicles that leave the parenchyma dorsally. An exceptional point about which there is no information in the literature is the profuse cellular migration that occurs from the sensory epithelium to the nerve fascicles (Fig. 6). This cell migration was positive for immunohistochemical labelling with anti-GAP-43 and histochemical labelling with both the UEA and LEA lectins, but it was negative when labelled with anti-LHRH; this indicates that this migration is not analogous to that described in rat and mouse prenatal foetuses, which originates from the vomeronasal part of the olfactory placode to the hypothalamus and is mostly comprised of immunopositive LHRH cells[71]. It is difficult to hypothesise about the significance of these cells since this is an unprecedented finding in both the olfactory and vomeronasal nerves. Although further studies should clarify the nature and fate of these cells, the immunopositivity for GAP-43 suggests to their neuronal nature.

With regard to the morphology of the AOB, our observations in the newborn capybara show that from birth, the macroscopic and microscopic organisation of the AOB are already defined, showing that the AOB of the capybara has a differentiated laminar pattern (Fig. 7), similar to that found in other rodents[39], lagomorphs, marsupials and prosimians[72–74]. From the macroscopic point of view, it is remarkable that in the specimens studied by Suárez et al.[23], the arrival of the VNN to the AOB is described as occurring from the lateral side of the bulb. Our dissections and histological series show that the arrival takes place through the medial side of the bulb (Fig. 7D), as happens in other rodents such as rats and mice and in most of the mammals studied, even belonging to other families[75,76]. However, as McCotter himself describes in the guinea pig[75], a Hystricognathi rodent like the capybara constitutes an exception to this pattern, since in this species the arrival of the nerve takes place through the ventrolateral part of the bulb. Although we did not have access to adult individuals that could help us to elucidate this aspect, access to the Comparative Mammalian Brain Collections from the Universities of Wisconsin and Michigan State (https://brainmuseum.org/) allowed us to study a Nissl cross section of the adult capybara brain (Specimen 62-621, section 160). It clearly shows the arrival of the VNN to the AOB from the medial side of the left hemi-brain. Future studies should clarify this issue.

In summary, our observations show that after birth, the capybara VNS does possess: (1) A VNO that communicates directly with the nasal cavity, and indirectly with the oral cavity; (2) A VNO and an AOB that are morphologically similar to those of the adult; (3) Active secretory vomeronasal glands; (4) The same Gαo and Gαi2 sensitivity of the neurosensory epithelium, VNNs, and nervous and glomerular AOB layers as has been described in adult capybara; and (5) Almost all of the neurochemical markers employed show an activity typical of adult animals.

On the basis of these findings, the general conclusion may be drawn that the VNS of the capybara at birth is capable of establishing the same function as that of the adult animal. If we add to this our observations on the

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

degree of differentiation of the AOB and the active cellular migration that occurs in the epithelium of the VNO, which is not described in any other mammalian species, we can conclude by considering the capybara as an excellent and promising model for the study of chemical communication in the first days of life.

Received: 11 April 2020; Accepted: 22 July 2020
Published online: 06 August 2020

References

1. Keverne, E. B. Pheromones, vomeronasal function, and gender-specific behavior. *Cell* **108**, 735–738 (2002).
2. Kelliher, K. R. The combined role of the main olfactory and vomeronasal systems in social communication in mammals. *Horm. Behav.* **52**, 561–570 (2007).
3. Meisami, E. & Bhatnagar, K. P. Structure and diversity in mammalian accessory olfactory bulb. *Microsc. Res. Tech.* **43**, 476–499 (1998).
4. Grus, W. E. & Zhang, J. Rapid turnover and species-specificity of vomeronasal pheromone receptor genes in mice and rats. *Gene* **340**, 303–312 (2004).
5. Martín-Sánchez, A. *et al.* From sexual attraction to maternal aggression: when pheromones change their behavioural significance. *Horm. Behav.* **68**, 65–76 (2015).
6. Leinders-Zufall, T. *et al.* A family of nonclassical class I MHC genes contributes to ultrasensitive chemodetection by mouse vomeronasal sensory neurons. *J. Neurosci.* **34**, 5121–5133 (2014).
7. Papes, F., Logan, D. W. & Stowers, L. The vomeronasal organ mediates interspecies defensive behaviors through detection of protein pheromone homologs. *Cell* **141**, 692–703 (2010).
8. Bufe, B. *et al.* Bacterial MgrB peptide activates chemoreceptor Fpr3 in mouse accessory olfactory system and drives avoidance behaviour. *Nat. Commun.* **10**, 4889 (2019).
9. Smith, J., Hurst, J. L. & Barnard, C. J. Comparing behaviour in wild and laboratory strains of the house mouse: levels of comparison and functional inference. *Behav Process.* **32**, 79–86 (1994).
10. Derrickson, E. M. Comparative reproductive strategies of altricial and precocial eutherian mammals. *Funct. Ecol.* **6**, 57–65 (1992).
11. Scheiber, I. B. R., Weiß, B. M., Kingma, S. A. & Komdeur, J. The importance of the altricial – precocial spectrum for social complexity in mammals and birds – a review. *Front. Zool.* **14**, 3 (2017).
12. Suárez, R., García-González, D. & de Castro, F. Mutual differences between the main olfactory and vomeronasal systems in development and evolution. *Front. Neuroanat.* **6**, 1–14 (2012).
13. Brunjes, P. C. Olfactory bulb maturation in *Acomys cahirinus*: is neural growth similar in precocial and altricial murids?. *Brain Res.* **284**, 335–341 (1983).
14. Leon, M., Coopersmith, R., Ulibarri, C., Porter, R. H. & Powers, J. B. Development of olfactory bulb organization in precocial and altricial rodents. *Brain Res.* **314**, 45–53 (1984).
15. Salazar, I. & Sánchez-Quinteiro, P. Differential development of binding sites for four lectins in the vomeronasal system of juvenile mouse: from the sensory transduction site to the first relay stage. *Brain Res.* **979**, 15–26 (2003).
16. Oikawa, T., Shimamura, K., Saito, T. R. & Taniguchi, K. Fine structure of the vomeronasal organ in the chinchilla (*Chinchilla laniger*). *Jikken Dobutsu* **43**, 487–497 (1994).
17. Jurcisek, J. A., Durbin, J. E., Kusewitt, D. F. & Bakaletz, L. O. Anatomy of the nasal cavity in the chinchilla. *Cells Tissues Org.* **174**, 136–152 (2003).
18. Sugai, T., Sugitani, M. & Onoda, N. Subdivisions of the guinea-pig accessory olfactory bulb revealed by the combined method with immunohistochemistry, electrophysiological, and optical recordings. *Neuroscience* **79**, 871–885 (1997).
19. Suárez, R. & Mpodozis, J. Heterogeneities of size and sexual dimorphism between the subdomains of the lateral-innervated accessory olfactory bulb (AOB) of *Octodon degus* (Rodentia: Hystricognathi). *Behav. Brain Res.* **198**, 306–312 (2009).
20. Fernández-Aburto, P., Delgado, S. E., Sobrero, R. & Mpodozis, J. Can social behaviour drive accessory olfactory bulb asymmetries? Sister species of caviomorph rodents as a case in point. *J. Anat.* **236**, 612–621 (2020).
21. Dennis, J. C. *et al.* Is the mole rat vomeronasal organ functional?. *Anat. Rec.* **303**, 318–329 (2020).
22. Browe, B. M., Vice, E. N. & Park, T. J. Naked mole-rats: blind, naked, and feeling no pain. *Anat. Rec.* **303**, 77–88 (2020).
23. Suárez, R. *et al.* Share and differential traits in the accessory olfactory bulb of caviomorph rodents with particular reference to the semiaquatic capybara. *J. Anat.* **218**, 558–565 (2011).
24. Salazar, I., Cifuentes, J. M. & Sanchez-Quinteiro, P. Morphological and immunohistochemical features of the vomeronasal system in dogs. *Anat. Rec.* **296**, 146–155 (2013).
25. Salazar, I. & Sánchez-Quinteiro, P. Lectin binding patterns in the vomeronasal organ and accessory olfactory bulb of the rat. *Anat. Embryol.* **198**, 331–339 (1998).
26. Shapiro, L. S., Ee, P. L. & Halpern, M. Lectin histochemical identification of carbohydrate moieties in opossum chemosensory systems during development, with special emphasis on VVA-identified subdivisions in the accessory olfactory bulb. *J. Morphol.* **224**, 331–349 (1995).
27. Shinohara, H., Asano, T. & Kato, K. Differential localization of G-proteins Gi and Go in the accessory olfactory bulb of the rat. *J. Neurosci.* **12**, 1275–1279 (1992).
28. Jia, C. & Halpern, M. Subclasses of vomeronasal receptor neurons: differential expression of G proteins (Gi alpha 2 and G (o alpha)) and segregated projections to the accessory olfactory bulb. *Brain Res.* **719**, 117–128 (1996).
29. Ortiz-Hidalgo, C. Abelardo Gallego (1879–1930) and his contributions to histotechnology: the Gallego stains. *Acta Histochem.* **113**, 189–193 (2011).
30. Tolivia, J., Tolivia, D. & Navarro, A. New technique for differential staining of myelinated fibers and nerve cells on paraffin sections. *Anat. Rec.* **222**, 437–440 (1998).
31. Salazar, I. & Sánchez-Quinteiro, P. The risk of extrapolation in neuroanatomy: The case of the mammalian vomeronasal system. *Front. Neuroanat.* **3**, 22 (2009).
32. D'Oliveira Albanus, R., Siqueira Dalmolin R.J., Rybarczyk-Filho, J.L., Alves Castro, M.A. & Fonseca Moreira, J.C. Differential evolutionary constraints in the evolution of chemoreceptors: a murine and human case study. *Sci. World J.* **23**, 696485 (2014).
33. Keverne, E. B. Odor here, odor there: chemosensation and reproductive function. *Nat. Neurosci.* **8**, 1637–1638 (2005).
34. Brennan, P. A. & Zufall, F. Pheromonal communication in vertebrates. *Nature* **444**, 308–315 (2006).
35. Harr, B. *et al.* Genomic resources for wild populations of the house mouse, *Mus musculus* and its close relative *Mus spretus*. *Sci. Data* **3**, 160075 (2016).
36. Miglino, M. A., Dos Santos, T. C., Kanashiro, C. & Dos Santos Ferraz, R. H. Morphology and reproductive physiology of female capybaras. In *Capybara: Biology, Use and Conservation of an Exceptional Neotropical Species* (eds Moreira, J. *et al.*) 131–146 (Springer, New York, NY, 2013).
37. Salazar, I., Sánchez-Quinteiro, P., Lombardero, M., Alemañ, N. & Fernández, P. The prenatal maturity of the accessory olfactory bulb in pigs. *Chem. Senses* **29**, 3–11 (2004).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

38. Salazar, I., Lombardero, M., Alemañ, N. & Sánchez-Quinteiro, P. Development of the vomeronasal receptor epithelium and the accessory olfactory bulb in sheep. *Microsc. Res. Tech.* **61**, 438–447 (2003).
39. Salazar, I., Sánchez-Quinteiro, P., Lombardero, M. & Cifuentes, J. M. Histochemical identification of carbohydrate moieties in the accessory olfactory bulb of the mouse using a panel of lectins. *Chem. Sens.* **26**, 645–652 (2001).
40. Kondoh, D., Kamikawa, A., Sasaki, M. & Kitamura, N. Localization of α1-2 fucose glycan in the mouse olfactory pathway. *Cells Tissues Org.* **203**, 20–28 (2017).
41. Suárez, R., Fernández-Aburto, P., Manger, P. R. & Mpodozis, J. Deterioration of the Gαo vomeronasal pathway in sexually dimorphic mammals. *PLoS ONE* **6**, 10 (2011).
42. Malz, C. R., Knabe, W. & Kuhn, H. J. Calretinin immunoreactivity in the prenatally developing olfactory systems of the tree shrew *Tupaia belangeri*. *Anat. Embryo.* **205**, 83–97 (2002).
43. Briñón, J. G. *et al.* Calretinin-, neurocalcin-, and parvalbumin-immunoreactive elements in the olfactory bulb of the hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *J. Comput. Neurol.* **429**, 554–570 (2001).
44. Brunjes, P. C., Jazaeri, A. & Sutherland, M. J. Olfactory bulb organization and development in *Monodelphis domestica* (grey short-tailed opossum). *J. Comput. Neurol.* **320**, 544–554 (1992).
45. Salazar, I., Sánchez-Quinteiro, P., Cifuentes, J. M. & Fernández, P. General organization of the perinatal and adult accessory olfactory bulb in mice. *Anat. Rec.* **288**, 1009–1025 (2006).
46. Dehmelt, L. & Halpain, S. The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol.* **6**, 204 (2005).
47. Schoenfeld, T. A., McKerracher, L., Obar, R. & Vallee, R. B. MAP 1A and MAP 1B are structurally related microtubule associated proteins with distinct developmental patterns in the CNS. *J. Neurosci.* **9**, 1712–1730 (1989).
48. Viereck, C., Tucker, R. P. & Matus, A. The adult rat olfactory system expresses microtubule-associated proteins found in the developing brain. *J. Neurosc.* **9**, 3547–3557 (1989).
49. Halpern, M., Shapiro, L. S. & Jia, C. Heterogeneity in the accessory olfactory system. *Chem. Senses* **23**, 477–481 (1998).
50. Shapiro, L. S., Roland, R. M. & Halpern, M. Development of olfactory marker protein and N-CAM expression in chemosensory systems of the opossum, *Monodelphis domestica*. *J. Morphol.* **234**, 109–129 (1997).
51. Villamayor, P. R., Cifuentes, J. M., Fdz-de-Troconiz, P. & Sanchez-Quinteiro, P. Morphological and immunohistochemical study of the rabbit vomeronasal organ. *J. Anat.* **233**, 814–827 (2018).
52. Salazar, I., Sánchez-Quinteiro, P. & Cifuentes, J. M. The soft-tissue components of the vomeronasal organ in pigs, cows and horses. *Anat. Histol. Embryol.* **26**, 179–186 (1997).
53. Smith, T. D. *et al.* The vomeronasal organ of *Lemur catta*. *Am. J. Primatol.* **77**, 229–238 (2015).
54. Vacarezza, O. L., Sepich, L. N. & Tramezzani, J. H. The vomeronasal organ of the rat. *J. Anat.* **132**, 167–185 (1981).
55. Rodewald, A., Gisder, D., Gebhart, V. M., Oehring, H. & Jirikowski, G. F. Distribution of olfactory marker protein in the rat vomeronasal organ. *J. Chem. Neuroanat.* **77**, 19–23 (2016).
56. Salazar, I., Sánchez-Quinteiro, P., Cifuentes, J. M., Fernández, P. & Lombardero, M. Distribution of the arterial supply to the vomeronasal organ in the cat. *Anat. Rec.* **247**, 129–136 (1997).
57. Eccles, R. Autonomic innervation of the vomeronasal organ of the cat. *Physiol. Behav.* **28**, 1011–1015 (1982).
58. Meredith, M., Marques, D. M., O'Connell, R. J. & Stern, F. L. Vomeronasal pump: significance for male hamster. *Sex. Behav. Sci.* **207**, 1224–1226 (1980).
59. Takami, S., Getchell, M. L. & Getchell, T. V. Resolution of sensory and mucoid glycoconjugates with terminal alpha-galactose residues in the mucomicrovillar complex of the vomeronasal sensory epithelium by dual confocal laser scanning microscopy. *Cell Tiss. Res.* **280**, 211–216 (1995).
60. Krishna, N. R., Getchell, M. L. & Margolis, F. L. Differential expression of vomeromodulin and odorant-binding protein, putative pheromone and odorant transporters, in the developing rat nasal chemosensory mucosae. *J. Neurosci. Res.* **40**, 54–71 (1995).
61. Bojsen-Møller, F. Topography of the nasal glands in rats and some other mammals. *Anat. Rec.* **150**, 11–24 (1964).
62. Cuschieri, A. & Bannister, L. H. The development of the olfactory mucosa in the mouse: light microscopy. *J. Anat.* **119**, 277 (1975).
63. Mendoza, A. S. & Kühnel, W. Morphological evidence for a direct innervation of the mouse vomeronasal glands. *Cell Tiss. Res.* **247**, 457–459 (1987).
64. Pastor, L. M. *et al.* Histochemical study of glycoconjugates in the nasal mucosa of the rat and guinea pig. *Histochem. J.* **24**, 727–736 (1992).
65. Kondoh, D. *et al.* Comparative histological studies on properties of polysaccharides secreted by vomeronasal glands of eight Laurasiatheria species. *Acta Histochem.* **122**, 151515 (2020).
66. Roslinski, D. L., Bhatnagar, K. P., Burrows, A. M. & Smith, T. D. Comparative morphology and histochemistry of glands associated with the vomeronasal organ in humans, mouse lemurs, and voles. *Anat. Rec.* **260**, 92–101 (2000).
67. Taniguchi, K. & Mochizuki, K. Morphological studies on the vomeronasal organ in the golden hamster. *Nihon Juigaku Zasshi* **44**, 419–426 (1982).
68. Spicer, S. S., Schulte, B. A. & Thomopoulos, G. N. Histochemical properties of the respiratory tract epithelium in different species. *Am. Rev. Respir. Dis.* **128**, S20–S26 (1983).
69. Takami, S., Getchell, M. L. & Getchell, T. V. Lectin histochemical localization of galactose, N-acetylgalactosamine, and N-acetylglucosamine in glycoconjugates of the rat vomeronasal organ, with comparison to the olfactory and septal mucosae. *Cell Tiss. Res.* **277**, 211–230 (1994).
70. Park, J. *et al.* Developmental changes affecting lectin binding in the vomeronasal organ of domestic pigs, *Sus scrofa*. *Acta Histochem.* **114**, 24–30 (2012).
71. Schwanzel-Fukuda, M. & Pfaff, D. W. Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature* **338**, 161–164 (1989).
72. Villamayor, P. R., Cifuentes, J. M., Quintela, L., Barcia, R. & Sánchez-Quinteiro, P. Structural, morphometric and immunohistochemical study of the rabbit accessory olfactory bulb. *Brain Struct. Funct.* **225**, 203–226 (2020).
73. Jia, C. & Halpern, M. Calbindin D28k, parvalbumin, and calretinin immunoreactivity in the main and accessory olfactory bulbs of the gray short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. *J. Morphol.* **259**, 271–280 (2004).
74. Skeen, L. C. & Hall, W. C. Efferent projections of the main and the accessory olfactory bulb in the tree shrew (*Tupaia glis*). *J. Comput. Neurol.* **172**, 1–35 (1977).
75. McCotter, R. E. The connection of the vomeronasal nerves with the accessory olfactory bulb in the opossum and other mammals. *Anat. Rec.* **6**, 299–318 (1912).
76. Mohrhardt, J., Nagel, M., Fleck, D., Ben-Shaul, Y. & Spehr, M. Signal detection and coding in the accessory olfactory system. *Chem. Senses* **43**, 667–695 (2018).

Acknowledgements

The authors thank MARCELLE NATURE PARK (Outeiro de Rei, Spain) for providing the animals employed in this study.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Author contributions

M.V.T., I.O.L., P.R.V., P.S.Q. designed the research., M.V.T., I.O.L., P.R.V., P.S.Q., A.F., J.L.R. performed the work, M.V.T., I.O.L., P.S.Q. analyzed and discussed the results and wrote the paper.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Correspondence and requests for materials should be addressed to P.S.-Q.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2020

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2 PUBLICACIÓN NÚMERO 2

Torres, M. V., Ortiz-Leal, I., Villamayor, P. R., Ferreiro, A., Rois, J. L., & Sanchez-Quinteiro, P. Does a third intermediate model for the vomeronasal processing of information exist? Insights from the macropodid neuroanatomy. *Brain Structure and Function* 227(3), 881-899 (2022).

https://doi.org/10.1007/s00429-021-02425-2

Revista: Brain Structure & Function

Año de publicación: 2022

Editorial: Springer Nature

ISSN: 1863-2661

Citas en Google Scholar: 8

Índices de calidad de la revista:

Factor de impacto (2022): 3.1

Categoría (2022):

Anatomy & Morphology Q1 (D1) (1/20)

Contribución del doctorando: M. V. T. diseñó la investigación, realizó el trabajo, analizó y discutió los resultados y escribió el artículo.

Autorización de la revista/editorial: Contenido reproducido bajo las condiciones de Copyright (2022) Creative Commons Attribution (CC BY 4.0).

Funding Open Access funding provided thanks to the CRUE-CSIC agreement with Springer Nature. This work was partially supported by a University of Santiago de Compostela Grant [1551-8179] to P.S.Q.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Brain Structure and Function
https://doi.org/10.1007/s00429-021-02425-2

ORIGINAL ARTICLE

Does a third intermediate model for the vomeronasal processing of information exist? Insights from the macropodid neuroanatomy

Mateo V. Torres[1] · Irene Ortiz-Leal[1] · Paula R. Villamayor[1,2] · Andrea Ferreiro[3] · José Luis Rois[3] · Pablo Sanchez-Quinteiro[1]

Received: 1 September 2021 / Accepted: 7 November 2021
© The Author(s) 2021

Abstract

The study of the α-subunit of Gi2 and Go proteins in the accessory olfactory bulb (AOB) was crucial for the identification of the two main families of vomeronasal receptors, V1R and V2R. Both families are expressed in the rodent and lagomorph AOBs, according to a segregated model characterized by topographical anteroposterior zonation. Many mammal species have suffered from the deterioration of the Gαo pathway and are categorized as belonging to the uniform model. This scenario has been complicated by characterization of the AOB in the tammar wallaby, *Notamacropus eugenii*, which appears to follow a third model of vomeronasal organization featuring exclusive Gαo protein expression, referred to as the intermediate model, which has not yet been replicated in any other species. Our morphofunctional study of the vomeronasal system (VNS) in Bennett's wallaby, *Notamacropus rufogriseus,* provides further information regarding this third model of vomeronasal transduction. A comprehensive histological, lectin, and immunohistochemical study of the Bennett's wallaby VNS was performed. Anti-Gαo and anti-Gαi2 antibodies were particularly useful because they labeled the transduction cascade of V2R and V1R receptors, respectively. Both G proteins showed canonical immunohistochemical labeling in the vomeronasal organ and the AOB, consistent with the anterior–posterior zonation of the segregated model. The lectin *Ulex europaeus* agglutinin selectively labeled the anterior AOB, providing additional evidence for the segregation of vomeronasal information in the wallaby. Overall, the VNS of the Bennett's wallaby shows a degree of differentiation and histochemical and neurochemical diversity comparable to species with greater VNS development. The existence of the third intermediate type in vomeronasal information processing reported in *Notamacropus eugenii* is not supported by our lectin-histochemical and immunohistochemical findings in *Notamacropus rufogriseus*.

Keywords Wallaby · Marsupials · Vomeronasal · Accessory olfactory bulb · G proteins · Immunohistochemistry

Introduction

The sense organs transmit physical (sight, hearing, and touch) or chemical (smell and taste) signals. In particular, the processing regions associated with smell are anatomically connected to the limbic system, and smell is, therefore, intimately linked to memories, emotions, and behavior (Müller-Schwarze 2006). Parallel to the olfactory system is the vomeronasal or accessory olfactory system, and the vomeronasal organ (VNO), which is the primary organ involved in this system (Wysocki and Lepri 1991; Halpern and Martínez Marcos 2003), is also found in the nose, specialized in mediating innate behaviors, as territorial aggression (Chamero et al. 2007) and maternal behavior (Keverne 2002).

Morphologically, the vomeronasal system (VNS) is primarily comprised of the VNO, the vomeronasal nerves

Mateo V. Torres and Irene Ortiz-Leal are joint first authors.

✉ Pablo Sanchez-Quinteiro
pablo.sanchez@usc.es

[1] Department of Anatomy, Animal Production and Clinical Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary, University of Santiago de Compostela, Av Carballo Calero s/n, 27002 Lugo, Spain

[2] Department of Zoology Genetics and Physical Anthropology, Faculty of Veterinary, University of Santiago de Compostela, Lugo, Spain

[3] Marcelle Nature Park, Outeiro de Rei, Lugo, Spain

Published online: 20 November 2021

(NVNs), and the accessory olfactory bulbs (AOB). In the 1970s, the first evidence was presented to indicate that this system was specialized for the detection of pheromones (Powers and Winans 1975), which are substances that establish chemical communication between individuals of the same species; pheromone-based communication does not reflect the simple transmission of information, as occurs in the main olfactory system, but rather serves as an interaction that elicits some type of non-conscious physiological or behavioral change in the receiver (Wyatt 2014). Pheromones modulate important aspects of reproduction (Martín-Sánchez et al. 2015; Demir et al. 2020), the adaptive response to stress (Papes et al. 2010; Pallé et al. 2019), and the social behaviors of animals (Ibarra-Soria et al. 2014; Cross et al. 2021). Thus, to intervene in chemical communications, a solid morphofunctional foundation of the VNS is necessary to allow for the understanding of the mechanism of action mediated by various pheromones in different species. These attempts have been hampered by the broad morphofunctional (Salazar et al. 2007; Stoyanov et al. 2021), molecular (Isogai et al. 2011; Katreddi and Forni 2021), and genomic (Grus et al. 2005; Villamayor et al. 2021) diversity of this system among mammals, which makes the establishment of a valid general pattern challenging, even among species belonging to the same order, such as Rodentia (Torres et al. 2020).

The diversity of G protein alpha (Gα) subunit expression has been the subject of specific studies that were crucial to identifying the vomeronasal receptor (VR) family. The expression of Gαi and Gαo proteins were both first detected in the AOB by Shinohara et al. (1992), who observed that nerve endings of vomeronasal neuroreceptor cells innervating the AOB were organized into two regions: one rich in Gαi2 and the other rich in Gαo. This heterogeneous pattern was restricted to the nerve and glomerular layers of the AOB and was conserved in the NVNs. Determining the involvement of both G proteins in the signal transduction chain of VNO neuroreceptor cells was key to the identification of the two main VR families. First, 3 years after the identification of Gα protein expression in the AOB, a family of receptors, named V1R, was discovered in mice (Dulac and Axel 1995), and the pattern of V1R expression in the VNO coincided with the pattern of Gαi2 expression. Parallel studies examining Gαi2 and Gαo expression in both the VNO and the AOB, using immunohistochemistry in opossum (Halpern et al. 1995) and mouse (Jia and Halpern 1996) specimens and in situ hybridization in mice (Berghard and Buck 1996), demonstrated that both proteins are expressed in separate subpopulations of VNO neurons, which suggested the existence of two independent sensory transduction pathways. However, the second G protein receptor was not identified until 1997, when three different studies examining the expression of Gαo in the VNO simultaneously demonstrated the existence of a second VR family, named V2R (Herrada and Dulac 1997; Matsunami and Buck 1997; Ryba and Tindirelli 1997). Since then, the immunohistochemical characterization of Gαi2 and Gαo has been considered to serve as excellent phenotypic indicators of V1R and V2R expression in the VNS, respectively.

Initially, all mammals were thought to segregate vomeronasal sensory information into two neuronal subsets, determined by the expression patterns of the V1R and V2R receptors. However, the immunohistochemical study of the goat VNS did not identify Gαo-immunoreactivity in either the VNO or in the NVN layer of the AOB (Takigami et al. 2000), indicating the existence of a different projection pattern for vomeronasal neurons to the AOB in some mammals and highlighting the importance of performing comparative studies of the VNS in multiple species. Thus, studies performed across a range of mammals as allowed for the conclusion that two types of VNS organization exist. The segregated type, in which the VN neurons express both G proteins, Gαi2 and Gαo, is observed in Rodents, such as mouse, rat, octodon (Suarez and Mpodozis 2009), guinea pig (Takigami et al. 2004), and capybara (Suarez et al. 2011b; Torres et al. 2020); Lagomorpha, such as rabbit (Villamayor et al. 2018); Marsupials, including opossum (Halpern et al. 1995); and tenrecs (Suarez et al. 2009). The uniform type, in which the VN neurons only express a single G protein subtype, specifically the Gαi2 subunit, can be observed in goat (Takigami et al. 2000), sheep (Salazar et al. 2007), dog (Salazar et al. 2013), horse, marmoset, musk shrew (Takigami et al. 2004), squirrel, hyrax (Suarez et al. 2011a), and hippopotamus (Kondoh et al. 2017b).

The absence of the V2R pathway in the uniform model has been hypothesized to be closely related to the appearance of sexual dimorphism in mammals (Suarez et al. 2011a). This deterioration has become a challenge for understanding the role played by the VNS in mammals, and this complex panorama was further convoluted by the appearance of a study of the VNS in the marsupial tammar wallaby, *Notamacropus eugenii* (Schneider et al. 2012). This species presents a VNS organization similar to the uniform type, with the crucial difference that only immunopositivity against Gαo was identified, becoming the first species displaying a new, third type of vomeronasal pheromone transduction pathway organization, in which only the V2R pathway is conserved.

Since the publication of this study, no contributions to the literature have appeared that can either support or refute the existence of this third model, which remains an open question that must be viewed cautiously. The authors themselves presented some reasonable doubt; although they did not identify Gαi2 immunopositivity in the VNO and AOB, they did identify functional V1R receptor-encoding genes within the tammar wallaby

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

genome (Young et al. 2010). Although this suggested the existence of V1R receptor-expressing cells in the tammar wallaby VNS, V1R receptors could also be expressed in other tissues, such as the V1R expression observed in the rabbit testis (Xia et al. 2020; Villamayor et al. 2021).

To examine the potential existence of this third model of VNS organization, we performed a morphological and immunohistochemical study of the VNS of Bennett's wallaby, focusing on the expression of Gα subunits in the VNO and AOB. Additionally, we performed a comprehensive histological, lectin-histochemical, and immunohistochemical investigation of the entire VNS, employing antibodies against microtubule-associated protein 2 (MAP-2), glial fibrillary acidic protein (GFAP), growth-associated protein 43 (GAP43), calbindin, calretinin, olfactory marker protein (OMP), and the lectins *Ulex europaeus* agglutinin (UEA) and *Lycopersicon esculentum* agglutinin (LEA).

Materials and methods

Three adult individuals of Bennett's Wallaby (*Notamacropus rufogriseus*) used in our study were transferred by Marcelle Natural Park (Outeiro de Rei, Lugo) after dying of natural causes. After separating the heads from the carcass, the skin, jaws, tongue and eyes were dissected out, and a window opened in the dorsal part of the cranium. The fixatives used were 10% Formol and Bouin's fluid. In the latter, after 24 h, the samples were transferred to 70% alcohol.

Samples extraction

The following anatomical structures: nasal cavity (NC), vomeronasal organs (VNO), nasal septum mucosa and the olfactory bulbs (OB), were employed in the histological study. Additionally, a successful cannulation of the incisor canal was performed in one of the specimens.

Nasal cavity and vomeronasal organs

The entire NC was separated through a transverse incision made rostral to the ethmoidal fossa with the help of a rotary saw. In one individual, the resulting sample was destined to study the macroscopic and microscopic changes in the VNO topography. In a second one, after opening the NC laterally, the nasal conchae were removed. This allowed visualization of the entire nasal septum, where the VNO were identified on both sides of the base of the nasal septum. They were extracted under a surgical microscope, Zeiss OPMI 1 Ent.

Main and accessory olfactory bulbs

The olfactory bulbs are located deep in the ethmoidal fossa. To access them, with the help of a gouge forceps the bone was carefully removed from the orbital fossa, which laterally covers the bulbs. Then, the dura mater and olfactory nerves were dissected out, separating them with a scalpel from the cribriform ethmoid plate.

Samples processing for histological study

All samples were embedded in paraffin, except one NC that previously was decalcified in TBD-1 Shandon Decalcifier (Thermo, Pittsburgh, PA) continuously stirred for 9 days. Then, a series of equidistant transversal cuts were made in the NC from the tip of the nose to the caudal end of the vomeronasal cartilage, obtaining five blocks. They were photographed and after that, all the blocks were embedded in paraffin.

Cutting

With the help of a Leica Reichert Jung microtome, the paraffin blocks were cut with a thickness ranging from 5 to 8 mm, employing the thinner sections in the study of the VNO and the thicker one to the study of the AOB.

General histological stainings

We employed the following general histological stains: hematoxylin–eosin (HE), periodic acid-Schiff (PAS) and Alcian Blue (AB) for neutral and acidic mucopolysaccharides, respectively, and Nissl staining for nervous tissue. In addition, two other specific stains were performed:

Gallego's trichrome

Useful for the differentiation of the components of the connective tissue. It stains both erythrocytes and muscle fibers green, collagen light blue, epithelium and glandular tissue red, bone dark blue and cartilage purple. The protocol used by us has been detailed in Ortiz-Leal et al. (2020).

Tolivia

This technique allows to discriminate black myelinated nerve fibers and pink neuronal somas. The protocol followed by us is detailed in Villamayor et al. (2020).

Histochemical and immunohistochemical staining

A detailed account of the procedures is given in Torres et al. (2020).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Histochemical labeling with lectins (HQ)

Lectins are naturally occurring carbohydrate-binding molecule, that can be used to detect glycoconjugates in tissues. We have used two lectins; LEA, that comes from tomato, *Lycopersicon esculentum*, and recognizes *N*-acetyl-glucosamine (Salazar and Sanchez-Quinteiro 2003), and UEA that comes from gorse, *Ulex europaeus*, and labels the L-fucose pathway (Alroy et al. 1986).

The protocol for the LEA is as follows. (i) The tissular endogenous peroxidase activity is blocked to avoid interference with the final developing step by incubating in a 3% H_2O_2 solution for 10 min. (ii) Sections are incubated for 30 min at room temperature in 2% bovine serum albumin (BSA), which prevents nonspecific binding. (iii) The sections were incubated overnight (4 °C) in biotinylated LEA diluted in 0.5% BSA. The following day, samples were incubated (iv) for 90 min at room temperature in Vectastain ABC complex (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Finally, (v) the sections were developed by incubating the sections in a solution of 0.05% diaminobenzidine (DAB) and 0.003% H_2O_2 for 5–10 min until the desired color reaction is observed when monitored with the microscope.

The protocol for UEA began with the same first two steps. Subsequently, (iii) incubation with UEA lectin is carried out for 1 h at room temperature followed by (iv) 3 washes of 5 min in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.2), and (v) sections afterwards incubated for 12 h (4 °C) in a peroxidase conjugated immunoglobulin against UEA. Finally, the samples were developed (vi) by incubation in the same DAB solution as the UEA.

Immunohistochemical techniques (IHQ)

The first step was (i) to block endogenous peroxidase activity. Then, (ii) non-specific binding was blocked with 2.5% normal horse serum from the ImmPRESS Anti-Mouse IgG/Anti-rabbit IgG Reagent Kit (Vector Laboratories, CA, USA) for 30 min. (iii) The primary antibody was then added to the corresponding dilution (Table 1) and allowed to incubate overnight (4 °C). The next day, (iv) the samples were incubated for 20 min at room temperature with the corresponding ImmPRESS VR Polymer HRP anti-rabbit IgG reagent. Finally, and after (v) rinsing in Tris buffer (pH 7.61) for 10 min, (vi) the samples were finally developed using DAB as a chromogen in the same way as for lectins.

All immunohistochemical protocols were run with the appropriate controls. In the absence of a positive control from wallabies, we reproduced the whole histochemical procedure with mouse tissues known to express the respective antigens. Samples for which the primary antibody was replaced by antibody diluent were used as negative controls. For lectins, controls were performed both without the addition of lectins and with the preabsorption of lectins, using an excess amount of the corresponding sugar.

Confocal laser scanning microscopy

The autofluorescence imaging of elastic fibres of the VNO was performed by confocal laser scanning microscopy. After cryopreserving the samples in 30% sucrose, they were cut in a sliding microtome at 40 µm thickness, and stored in 0.1 M PB, pH 7.2, at 4 °C until free-floating processing. Sections were counterstained with TO-PRO-3 iodide (1 µM; Molecular Probes) for 15 min and mounted in Slow-Fade solution (Molecular Probes Cat. # S7461). A Bio-Rad MRC 1024 ES setup for dual-channel fluorescence using green autofluorescence and TO-PRO-3 iodide (far red fluorescence) filter settings (100 mW Ar laser, wavelength 488 nm, and He–Ne laser, wavelength 633 nm, respectively) were used. Images were taken using a 20 × lens (NA 0.45) on a Nikon TE 2000 inverted microscope, with separate emission filtering for each type of fluorescence (RIAIDT, University of Santiago de Compostela, Spain).

Table 1 Lectins and antibodies used. Species of elaboration, manufacturer, dilutions, catalog number

Ab/lectin	1st Ab species/dilution	1st Ab catalogue number	2nd Ab species/dilution/catalogue number
Anti-Gαo	Rabbit 1:100	MBL 551	ImmPRESS VR HRP Anti-Rabbit IgG Reagent MP-6401-15
Anti-Gαi2	Rabbit 1:100	Sta Cruz Biotechnology SC-7276	ImmPRESS VR HRP Anti-Rabbit IgG Reagent MP-6401-15
Anti-OMP	Goat 1:400	Wako S44-10001	Horse 1:250 Vector BA-9500
Anti-MAP2	Mouse 1:200	Sigma M4403	ImmPRESS VR HRP Anti-Mouse IgG Reagent MP-6402-15
Anti-GAP43	Mouse 1:800	Sigma G9264	ImmPRESS VR HRP Anti-Mouse IgG Reagent MP-6402-15
Anti-GFAP	Rabbit 1:400	Dako Z0334	ImmPRESS VR HRP Anti-Rabbit IgG Reagent MP-6401-15
Anti-CB	Rabbit 1:6000	Swant CB38	ImmPRESS VR HRP Anti-rabbit IgG Reagent MP-6401-15
Anti-CR	Rabbit 1:6000	Swant 7697	ImmPRESS VR HRP Anti-rabbit IgG Reagent MP-6401-15
UEA-I	1:10	Vector L-1060	Rabbit 1:50 DAKO P289
LEA	20 µg/ml	Vector B-1175	Vectastain ABC reagent PK-4000

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Acquisition of images and digital treatment

Images were taken using the Karl Zeiss Axiocam MRc5 digital camera coupled to a Zeiss Axiophot microscope. If needed, Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems, San Jose, CA) was used to adjust parameters such as contrast or brightness, balance light levels, and crop or resize images for presentation in this work. No specific characteristics within the images were altered, enhanced, moved or introduced.

Results

Macroscopic study

The primary anatomical landmarks identified for Bennett's wallaby VNS are shown in Figs. 1, 2, 3. Cross-sections made along the entire length of the decalcified nasal cavity allowed us to define the exact location of the VNO within the anterior half of the nasal cavity and to identify topographic relationships (Fig. 1A–D). The VNO occupies the ventral recess of the cavity, lying on both sides of the nasal septum. Its shape is elongated in the dorsoventral axis and relatively narrow in the lateromedial direction, especially in the more caudal part of the organ. This shape is proportional to the dorsoventrally elongated nasal septum of this species (Fig. 1A). The medial side of the VNO lays over the lateral lamina of the vomer bone, and the ventral portion of the VNO rests on the continuous ridge formed by the palatine processes of the incisive and maxillary bones. The latter forms two thin lateral projections in its dorsal crest that widen the surface of contact with the organ (Fig. 1D).

The dissection and extraction of both complete VNOs were aided by the information obtained from the cross-sectional study. Two longitudinal sections of the nasal cavity, one dorsal section, along the left nasal bone, and one ventral section, in a left parasagittal plane, allowed for the removal of the lateral nasal cavity wall and the nasal turbinates that originate from the nasal cavity wall, making the nasal septum visible (Fig. 2A, B). The nasopalatine duct could then be progressively cannulated from the nasal cavity (Figs. 2C, Fig. 3A, B) to the oral cavity due to the presence of a functional palatal fissure, as demonstrated in the skull (Fig. 3C). The thickness and pigmentation of the nasal mucosa prevented the identification of the projection area of the VNO or the NVN path (Fig. 3B). Progressively lifting the mucosa in the rostro-caudal direction, separating the mucosa from the nasal septum, allowed access to the VNO, which occupies the curved lateral recess formed by the vomer bone (Fig. 3D). Once the VNOs were dissected out, their nature was confirmed by cross-sectional

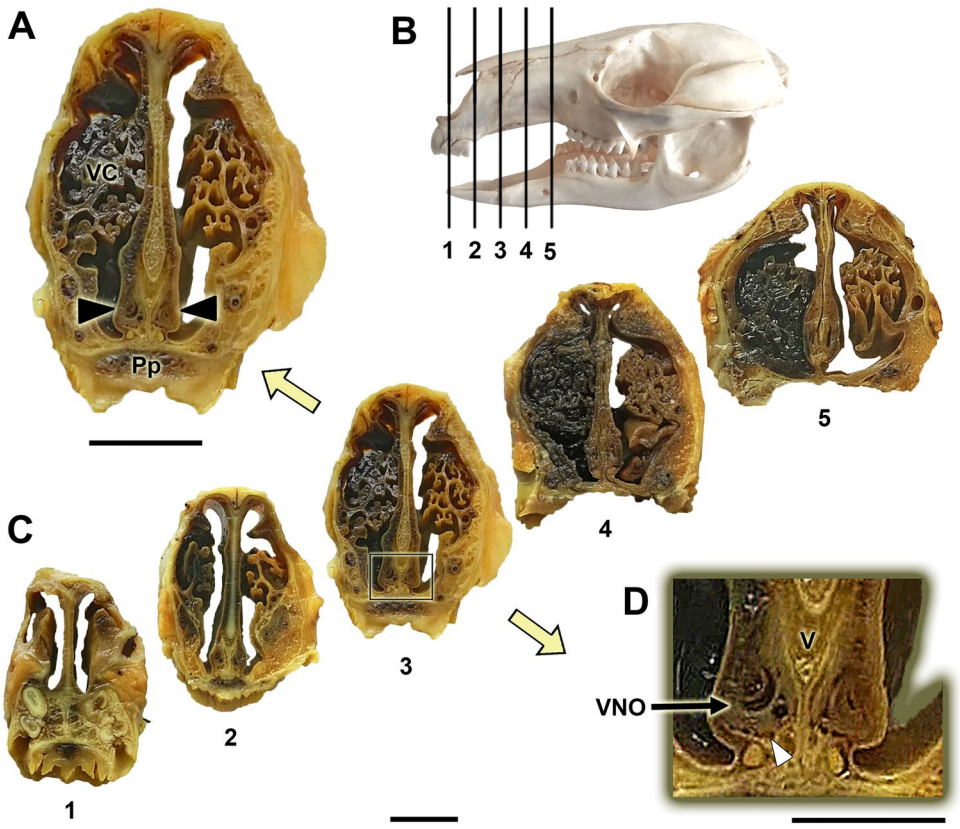

Fig. 1 Cross-sections of the Bennett's wallaby nasal cavity in five levels (C) ordered from rostral (1) to caudal (5). The levels of the sections are represented in the lateral view of the skull **(B).** The central part of the vomeronasal organ (VNO) is located at levels 3 and 4, and level 3 can be observed at higher magnification in **(A)**. The VNO occupies the ventral recess of the nasal cavity on both sides of the nasal septum (black arrowheads). **(D)** Higher magnification of the inset in (C, level 3) showing the VNO. The dorsal crest of the palatine process forms a lateral projection that supports the ventral part of the VNO (white arrowhead). Pp: Palatine process; V: Vomer; VC: Ventral concha. Scale bars: (A, C) 1 cm; (D) 0.5 cm

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

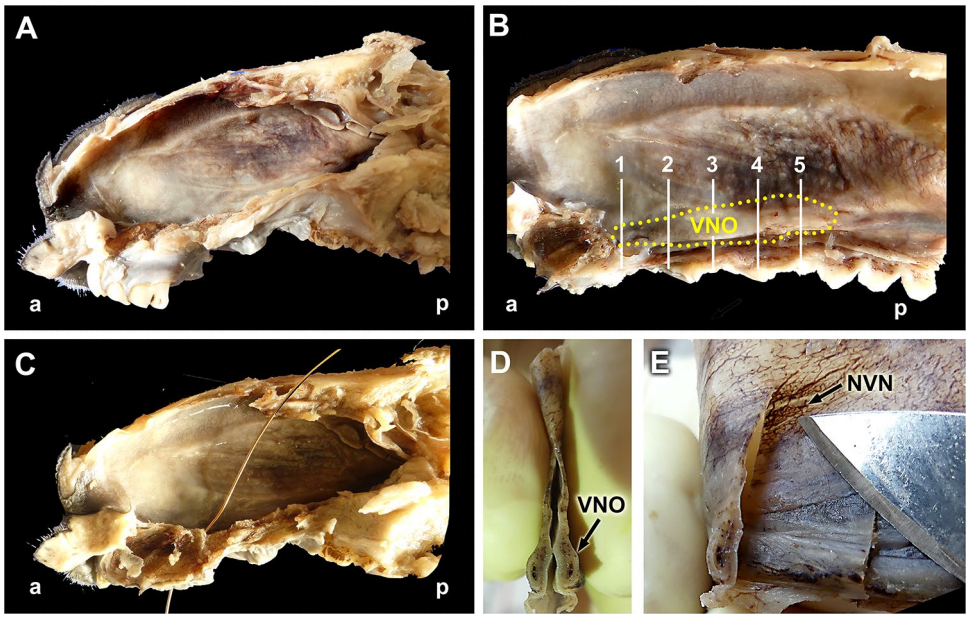

Fig. 2 Dissection of the Bennett's wallaby VNO. **(A)** Dissection plane after the removal of the lateral wall of the nasal cavity and the left nasal conchae. **(B)** A more advanced plane of dissection, from which the roof, floor, and incisor and canine teeth roots have been removed to delimit the projection area of the vomeronasal organ (VNO, dashed yellow line). The levels of the five sections described in Fig. 1 are indicated. **(C)** Cannulation through the nasopalatine duct demonstrates the functionality of the oro-nasal communication. **(D)** Cross section of the organ after extraction, showing its slender shape and the central vomeronasal duct. **(E)** By observing the translucent respiratory mucosa of the nasal cavity, the vomeronasal nerves (NVN, arrow) can be recognized. a: anterior; p: posterior; NVN: Vomeronasal nerves; VNO: Vomeronasal organ

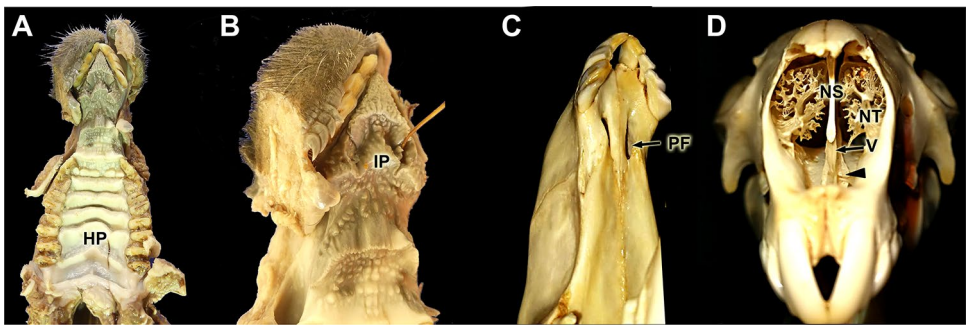

Fig. 3 Demonstration of the communication between the oral and nasal cavities. **(A)** Ventral view of the hard palate (HP). **(B)** Ventral view of the passage through the incisive papilla (IP) of the cannula showed in Fig. 2C. **(C)** Ventrolateral view of the bony palate showing the palatal fissure (PF). **(D)** Anterior view of the nasal cavity, in which the vomer bone (V), the cartilage of the nasal septum (NS), and the nasal turbinates (NT) are visible. The location of the vomeronasal organ (VNO) is indicated (arrowhead)

examination (Fig. 2D). Additionally, the observation of the mucosa against the light allowed us to visualize the branches of the NVNs (Fig. 2E).

To extract the whole brain, the lateral walls of the cranium were removed using a rotary saw and gouge forceps, completely revealing both hemiencephalons (Fig. 4A). The olfactory bulbs are housed in the narrow and slender ethmoidal fossa. The bulbs, as well as the rest of the rhinencephalon, olfactory tracts and tubercula, and piriform lobes, are well developed in this species (Fig. 4B–E). The AOB is easily recognizable in the dorsocaudal part of the olfactory bulb (Fig. 4F), because it is delimited by vascular formations. The arrival of the NVN is appreciable by its medial border.

Microscopic study

Histological, decalcified cross-sections of the whole snout from Bennett's wallaby confirmed the location of the VNO in the ventral recess of the nasal cavity at the base of the

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

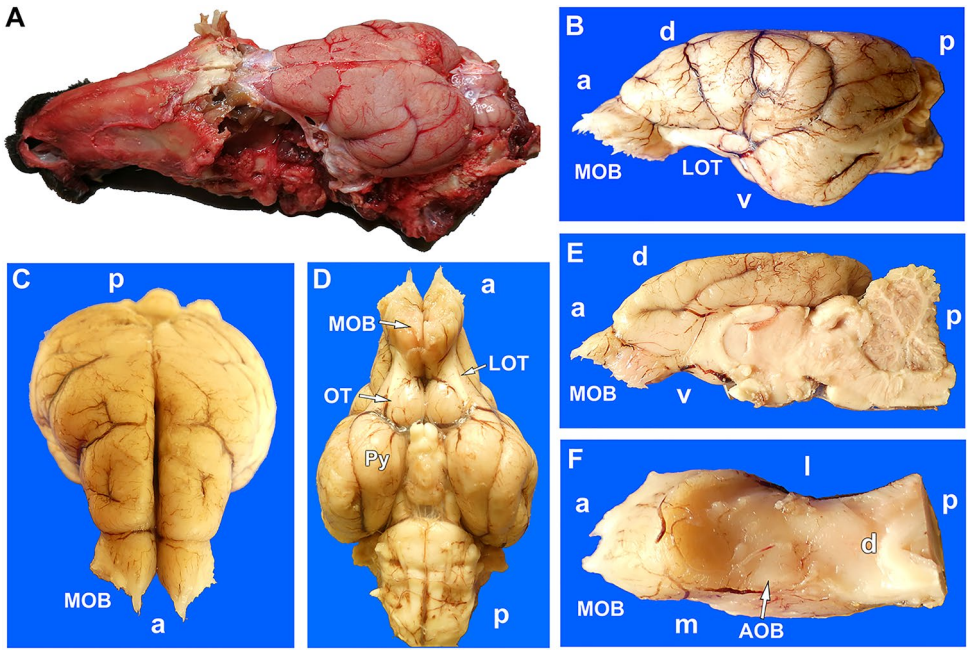

Fig. 4 Bennett's wallaby olfactory brain. **(A)** Dorsolateral view of the skull after the removal of the vault and side walls. The olfactory bulbs, in situ, are covered by the dura mater and are mostly hidden in the ethmoidal fossa. **(B)** Lateral, **(C)** anterodorsal, and **(D)** ventral views of the encephalon. In the ventral view, the remarkable development of the olfactory tubercles (OT) and the piriform lobes (Py) can be observed. **(E)** Medial view of the right hemiencephalon. **(F)** Once the cerebral hemisphere has been removed, in the dorsal view of the right olfactory bulb, an elevation, surrounded by blood vessels that corresponds to the accessory olfactory bulb (AOB) is observed medially. MOB, main olfactory bulb; LOT, lateral olfactory tubercles; directionality is indicated by the following: a, anterior; p, posterior; d, dorsal; v, ventral

nasal septum (Fig. 5A). The VNO of the Bennet's wallaby presents all the necessary components to perform its function in a highly developed fashion: a cartilaginous capsule (vomeronasal cartilage, VNC) and a vomeronasal duct (VND) associated with a soft tissue rich in veins, nerves, and glands. The organization of all these components varies noticeably along the rostrocaudal axis. Anteriorly (Fig. 5A, B), the cartilage is J-shaped, and the duct has a crescent or semilunar-like shape. The sensory neuroepithelium is arranged along the medial concave surface of the lumen, whereas the respiratory epithelium occupies a lateral location that covers the lateral luminal surface of the duct. The lateral soft tissue forms a recognizable mushroom body containing two or three large veins (Vv).

At a more caudal level (Fig. 5C, D), several significant changes can be observed in the structure of the VNO. The VND becomes more slender and elongated dorsoventrally, and remarkably, the VNC disappears completely. Therefore, the boundaries between the parenchyma and the respiratory mucosa of the nasal cavity are more diffuse. At both levels, the nasal mucosa is highly vascularized, comprising a dense network of subepithelial and periglandular capillaries.

The microscopic study of the dissected VNO was performed using histological stains and confocal microscopy on decalcified sections. The results are shown in Figs. 6, 7, 8. The lateral respiratory epithelium (Fig. 6A, B) has a ciliated pseudostratified appearance, with a small number of pseudolayers. An abundant number of periodic acid–Schiff (PAS)-positive and Alcian blue–positive goblet cells can be observed (Fig. 7C, D), similar to those that cover the respiratory mucosa of the nasal cavity. The columnar cells show a variable affinity for hematoxylin–eosin dyes, including strongly basophilic cells and others that are hardly stained. The medial neuroreceptor epithelium shows remarkable development, even though the receptor cells are not as densely packed as in other species. The receptor cells feature rounded nuclei that are variably stained by hematoxylin (Fig. 6C).

The cell limits are very well defined, to the point that the dendritic knobs approaching the lumen of the VND and the axonal projections toward the lamina propria are neatly differentiated. Gallego's trichrome stain (Fig. 6A, D) enhances the visualization of the nuclear morphology, the high development of the connective tissue in the lamina propria, and the profuse network of sensorial NVNs. The NVNs not only rest under the sensorial epithelium but also extend dorsally and ventrally around the two commissures of the duct and beyond. Atypically, the NVNs partially occupy the lamina propria of the VNO respiratory epithelium (Fig. 6F). Autofluorescence confocal microscopy allows for the recognition

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

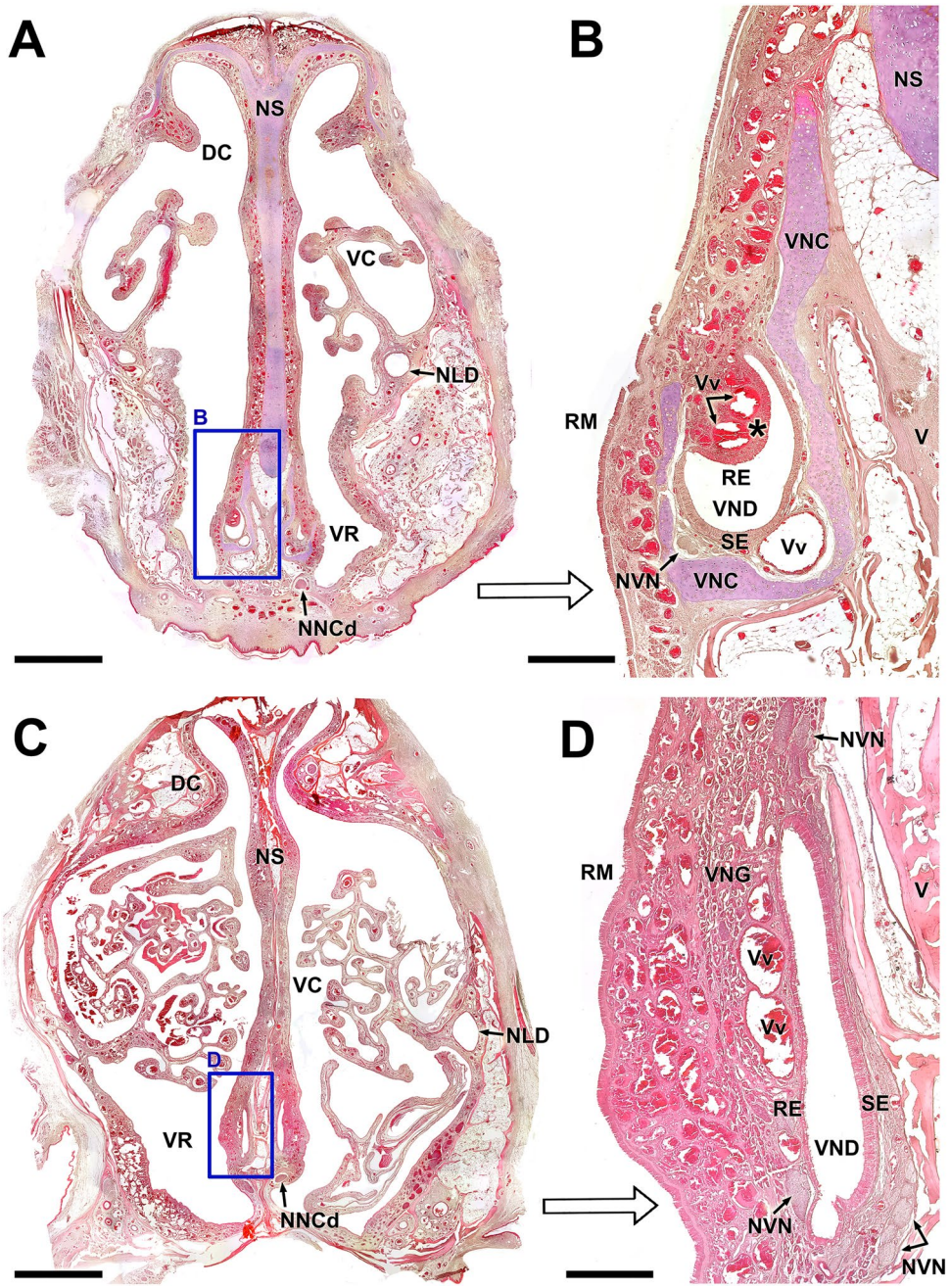

Fig. 5 Decalcified microscopic transverse sections of the Bennett's wallaby VNO. **A** Cross section of the anterior region of the nasal cavity (Level 2 in Fig. 1), showing the vomeronasal organs (VNOs) located in the ventral recess. The right VNO is framed and shown at a higher magnification in (**B**). At this level, the J-shaped vomeronasal cartilage (VNC) and the crescent-shaped vomeronasal duct (VND) are the primary landmarks of the organ. The lateral parenchyma forms a recognizable mushroom body (asterisk), containing two large veins (Vv) filled with blood in this sample. Together with the large ventromedial vein, they are responsible for the pumping mechanism of the organ. **C** Cross section of the central region of the nasal cavity (Level 4 in Fig. 1). The right VNO, shown in greater detail in (**D**), is located at the base of the nasal septum (NS), dorsal to the caudal nasal nerve passage. The VND is no longer crescent shaped, but dorsoventrally elongated, with a highly developed sensory neuroepithelium (SE) on the medial side. Remarkably, at this level, the VNO lacks any cartilaginous capsule. The amount of glandular tissue (VNG) is much greater, and new bundles of vomeronasal nerves (NVN) appear in the ventral and dorsal areas of the organ. DC: Dorsal concha; NLD: Nasolacrimal duct; NS: Nasal septum; RE: Respiratory epithelium; RM: Respiratory mucosa; V: Vomer bone; VC: Ventral concha. Stain: Hematoxylin–eosin. Scale bars: (A,C) 500 µm; (B,D) 150 µm

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

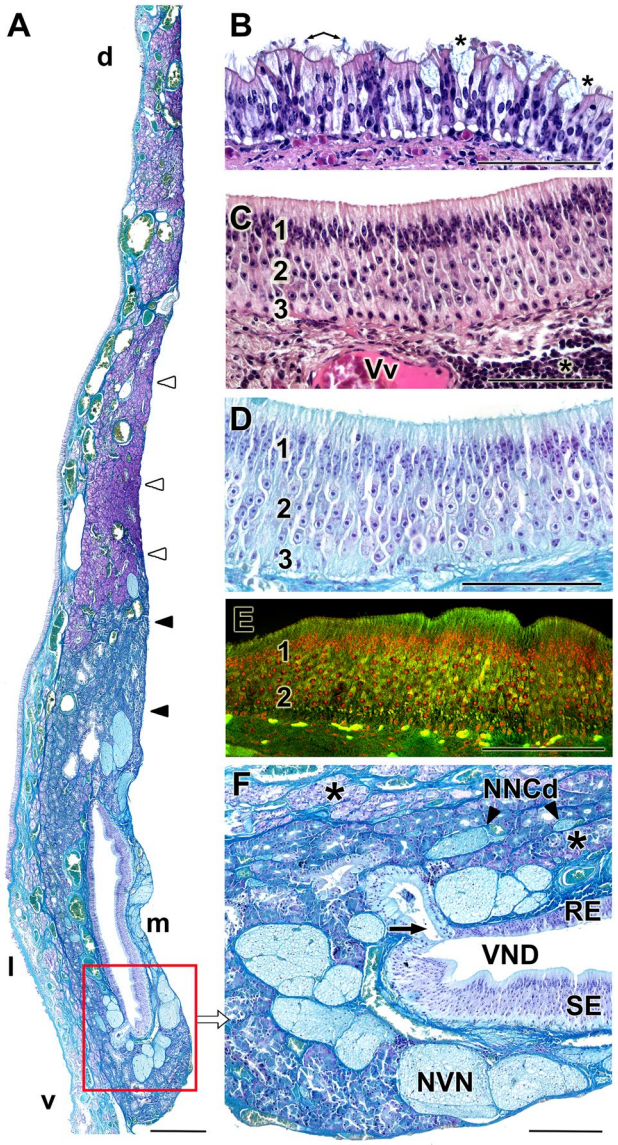

Fig. 6 Histology of the vomeronasal organ in the Bennett's wallaby. ▶ **A** Transverse section of the vomeronasal organ (VNO, level 4 in Fig. 1), showing the high level of development of the medial sensory epithelium (SE) and the number and thickness of the nerve trunks, arranged medially (m), dorsally (d) and ventrally (v) to the vomeronasal duct (VND). At this level, the glandular tissue is distributed along the entire medial part of the parenchyma, but with a much higher density dorsally to the VND. In this dorsal area, Gallego's staining allows for the differentiation of two compartments. The uppermost compartment (white arrowheads) is strongly stained with fuchsin, whereas the lower compartment (black arrowheads), closer to the VND, is weakly stained. **B** Respiratory epithelium (RE) of the VNO, containing goblet cells (asterisks) and cilia (arrows). **C** VNO neuroreceptor epithelium. The three main strata are differentiated: sustentacular cells (1), neuroreceptor cells (2), and basal cells (3). In the lamina propria, a vein (Vv) of great caliber and diffuse lymphoid tissue (asterisk) is visible. **D** Gallego's trichrome staining makes it possible to differentiate the cell edges and the characteristics of the nuclei. **E** Autofluorescence confocal microscopy of the sensory epithelium allows for the clear differentiation of the zones corresponding to the main strata (same numbering as in C and D). **F** Ventral commissure of the VND, in which the large opening of a gland (arrow), profuse myelin innervation corresponding to the vomeronasal nerves (NVN), and several additional branches of the caudal nasal nerve (NNCd, arrowheads) in direct contact with the vomeronasal glands (asterisks), are noticeable. RE: Respiratory epithelium; SE: Sensory epithelium; VND: Vomeronasal duct; d: dorsal; l: lateral; m: medial; v: ventral. Stains: (A, D, F) Gallego's Trichrome; (B, C) Hematoxylin–eosin; (E) Confocal microscopy. Scale bars: (A) 250 µm; (B-F) 100 µm

of the layers that form the receptor epithelium, which appears as bands: basal, receptor, and sustentacular cells and the zone of the cell processes (Fig. 6E). Additionally, the lamina propria of the sensory epithelium in the Bennet's wallaby has uniquely large veins and a huge accumulation of diffuse lymphoid tissue (Fig. 6C).

The glandular tissue within the VNO parenchyma is highly developed, surrounding the VND primarily on the lateral side. In the anterior zone of the VNO (level 2), the VNO parenchyma is concentrated in the elevated portion within the lateral mucosa, associated with the large veins that give it shape. The nature of this glandular tissue is tubulo-acinar (Fig. 7A), comprising mucoserous acini with PAS-positive and Alcian blue–negative secretions (Fig. 7C, D, respectively). Although this area is also rich in serous acinar Alcian blue–positive PAS-negative glands (Fig. 7D), they are associated with the respiratory mucosa of the nasal cavity. The caliciform cells in the respiratory epithelium of the VNO are both PAS- and Alcian blue–positive (Fig. 7C, D).

Caudally, in the central zone of the VNO, the lateral vomeronasal glands (VNG) decreases, and mucoserous acinar tissues invade the ventral and dorsal areas of the parenchyma (Fig. 6A, F). The morphology of the ventral glands is more visible in the confocal study (Fig. 7B), which reveals acini with a neat central cavity. Dorsally, the glands form large patches of glandular tissue that can be differentially stained using Gallego's trichrome stain (Fig. 6A); the lower patch, closer to the VND, is weakly stained by fuchsin, whereas the dorsal patch is strongly stained by fuchsin. Additionally, the ventral patches are primarily PAS-positive, whereas the dorsal patches are Alcian blue–positive (Suppl. Fig. 1). In the most caudal part of the VNO, coinciding with the blind sac of the VND, a huge density of PAS-positive serous glands can be observed (Fig. 8D, Suppl. Fig. 2).

The development of the NVN branches in the parenchyma is striking. From the anterior segment of the VNO, these unmyelinated branches join in large fascicles located dorsally, medially, and even ventrally to the duct (Figs. 6A, F, 7B, 8A, E). An important vegetative innervation from the autonomic nervous system was also observed, formed by myelinated fibers and derived from the caudal nasal nerve. These nerve bundles are located exclusively in the lateral parenchyma and are always closely related to the

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

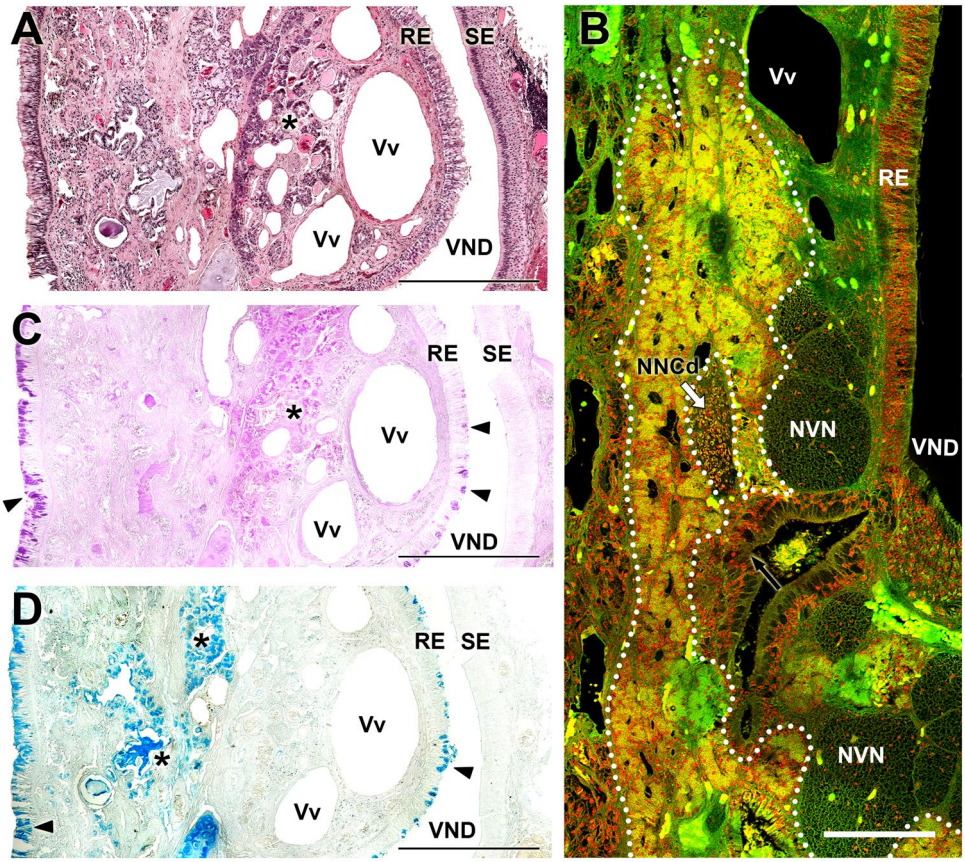

Fig. 7 Glandular component of the wallaby VNO. **A, C, and D** Consecutive serial sections of the anterior portion of the vomeronasal organ (VNO, at level 2 in Fig. 1), stained with (A) hematoxylin–eosin, (C) periodic acid–Schiff (PAS), and (D) Alcian blue. The PAS-positive glands are concentrated in the lateral parenchyma surrounding the venous sinuses, characteristic of this region (asterisk in C). In the lamina propria of the respiratory mucosa, just lateral to the VNO there are tubulo-acinar Alcian blue–positive glands (asterisks in D). The goblet cells of the respiratory epithelium (RE) contain secretions that are positive for both stains (arrowheads in C and D). **B** Confocal microscopy of the left area framed in Fig. 8B makes it possible to characterize the development of the glandular components in a more caudal level of the VNO (white dashed line). Remarkably, a large myelinic branch of the nasal caudal nerve (NNcD, white arrow) is associated with the glands. NVN: Vomeronasal nerve; RE: Respiratory epithelium; SE: Sensory epithelium; VND: Vomeronasal duct. Stains: (A), Hematoxylin–eosin; (B), Confocal; (C), PAS; (D), Alcian blue. Scale bars: (A, C, D) 500 µm; (B) 100 µm

VNG and the veinous (Figs. 6A, F, 7B, 8A, E) structures that they innervate.

The vascular component of the parenchyma primarily consists of large veins and venous sinuses that give the VNO the appearance typical of erectile tissue, especially in the anterior part of the duct (Fig. 8A). The presence of two or three large-caliber veins in the lamina propria of the medial sensory epithelium is remarkable (Fig. 8A). Arterial vessels in both the anterior and central levels are difficult to identify, even when using confocal microscopy, which typically allows for the visualization of the elastic tunic of the arteries due to the autofluorescent nature of elastin (Fig. 8C). However, in the most caudal portion of the organ, the caliber of the veins decreases (Fig. 7B), and the arterial vessels responsible for providing the blood supply to the large anterior venous network are noticeable (Fig. 8C, D).

Microscopically, the AOB shows an appreciable development, which matches the noticeable macroscopic appearance (Fig. 9A, B). Structurally, the AOB shows a well-differentiated laminar organization (Fig. 9D). The nerve and glomerular layers of the AOB are highly developed, similar to the development observed in the MOB. However, in the MOB, the mitral cell and plexiform layers are distinctly separated (Fig. 9C), whereas in the AOB, they reorganize into a joint mitral-plexiform layer, which contains diffusely arranged mitral cells (Fig. 9D). The mitral cells have a fusiform or polyhedric shape and are easily recognized by Tolivia staining (Fig. 9G).

Another remarkable feature in the microscopic organization of the wallaby AOB is the appreciable difference in size between the larger glomeruli of the anterior part and the smaller glomeruli in the posterior segment (Fig. 9E, F) and the great development of the white matter bundles that

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

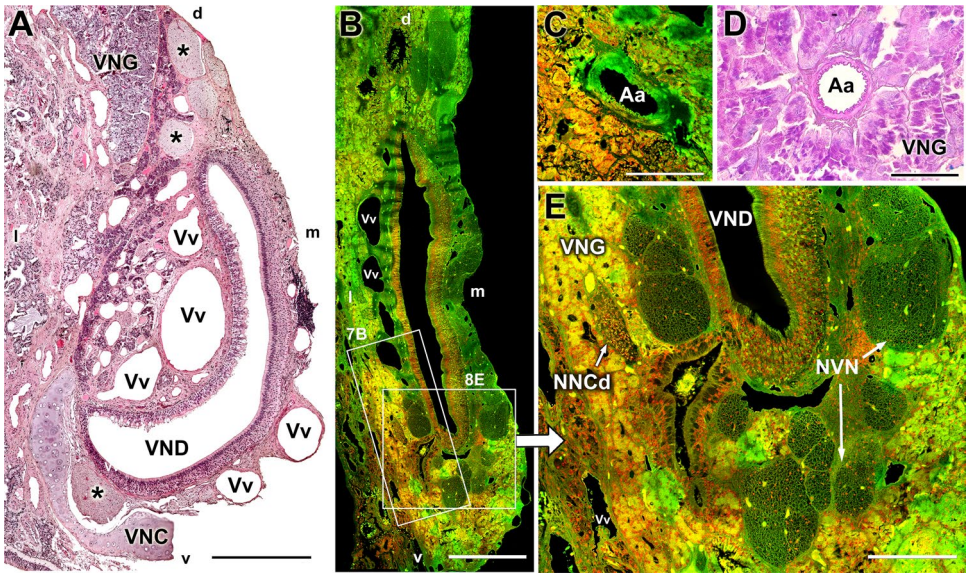

Fig. 8 Vascularization of the wallaby VNO. (**A**) In the anterior segment of the vomeronasal organ (VNO, Level 3 in Fig. 1), the presence of venous (Vv) sinuses stands out, which are distributed both in the elevation of the lateral part of the parenchyma and in the lamina propria of the medial mucosa. Vomeronasal nerves (NVN, asterisks) are located in both the dorsal and ventral commissures of the vomeronasal duct (VND). **(B)** Confocal microscopic autofluorescence image at a more caudal level (Level 4 in Fig. 1), showing the development of the lateral venous sinuses. **(C)** In a more caudal level (Level 5 in Fig. 1), autofluorescence allows for the identification of arteries (Aa) by their elastic tunic. **(D)** At the same caudal level of the VNO, the arteries are surrounded by periodic acid-Schiff (PAS)-positive glandular tissue. **(E)** Enlargement of the right box in B, showing the densely packed branches of the vomeronasal nerves and a branch of the nasal caudal nerve (NNCd) in the midst of vomeronasal glands (VNG). VNC: Vomeronasal cartilage; VND: Vomeronasal duct; d, dorsal; l, lateral; m, medial; v, ventral. Stains: (A) Hematoxylin–eosin; (D) PAS; (B, C, E) Confocal microscopy. Scale bars: (A) 500 µm; (B) 250 µm; (C, D, E) 100 µm

delimit a granular zone of relatively scarce development (Fig. 9B, D).

Immunohistochemical and lectin-histochemical study

Immunostaining of the VNO sensory epithelium using antibodies against the Gαo and Gαi2 proteins shows characteristic patterns. Gαo neuroreceptor cells are not excessively abundant but are labeled very neatly and with great intensity in the pericarion and along the dendritic and axonal prolongations. The soma are distributed along the entire thickness and perimeter of the neuroepithelium (Fig. 10A–C). Gαi2 cells are more numerous, but the labeling is less striking as it is primarily concentrated in the somas (Fig. 10D). For both markers, strong immunopositivity is observed in the vomeronasal nerves (Fig. 10A, B, E). Histochemical labeling with UEA lectin stains the entire receptor epithelium (Fig. 10F), although without labeling the entire population of neuroreceptor cells. UEA lectin produces an intense and sharp marking that affects both the dendrites in the luminal area of the sensory epithelium and the axons in the lamina propria (Fig. 10G, H).

The immunohistochemical labeling of G proteins in the AOB allowed us to confirm that the anteroposterior zonation suggested by the Nissl staining also reflects the differential expression of G proteins in the superficial layers of the AOB. Specifically, the anterior half of the VNL-GlL layers in the AOB is Gαi2-positive (Fig. 11A), whereas the posterior half is Gαo-positive, in a complementary manner (Fig. 11B). Additionally, Gαo positivity can be detected in the glomerular layer of the anterior zone. This zonation pattern was confirmed by the use of UEA lectin, which revealed a labeling pattern similar to that for anti-Gαi2, which was circumscribed to the anterior zone (Fig. 11C). UEA is not specific for the AOB and also stains the superficial layers of the MOB (Fig. 11E). The study using the LEA lectin showed the wide positive labeling of the superficial layers of both the AOB (Fig. 11D) and MOB (Fig. 11F).

Anti-OMP stains the superficial layers of both the AOB (Fig. 12A) and MOB (Fig. 12C). Anti-GFAP does not strongly stain the AOB, concentrating most of its labeling in the peripheral regions of the AOB, both anterior and posteriorly (Fig. 12B). In this latter area, anti-GFAP forms a dense network that accompanies the vomeronasal fibers of the nerve layer (Fig. 12D). Remarkably, astrocytes are not observed in the AOB, although they are observed in other areas of the olfactory brain, for instance, the anterior olfactory nucleus (Fig. 12F). Anti-MAP-2 stains the deeper layers of the AOB, the mitral-plexiform and

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

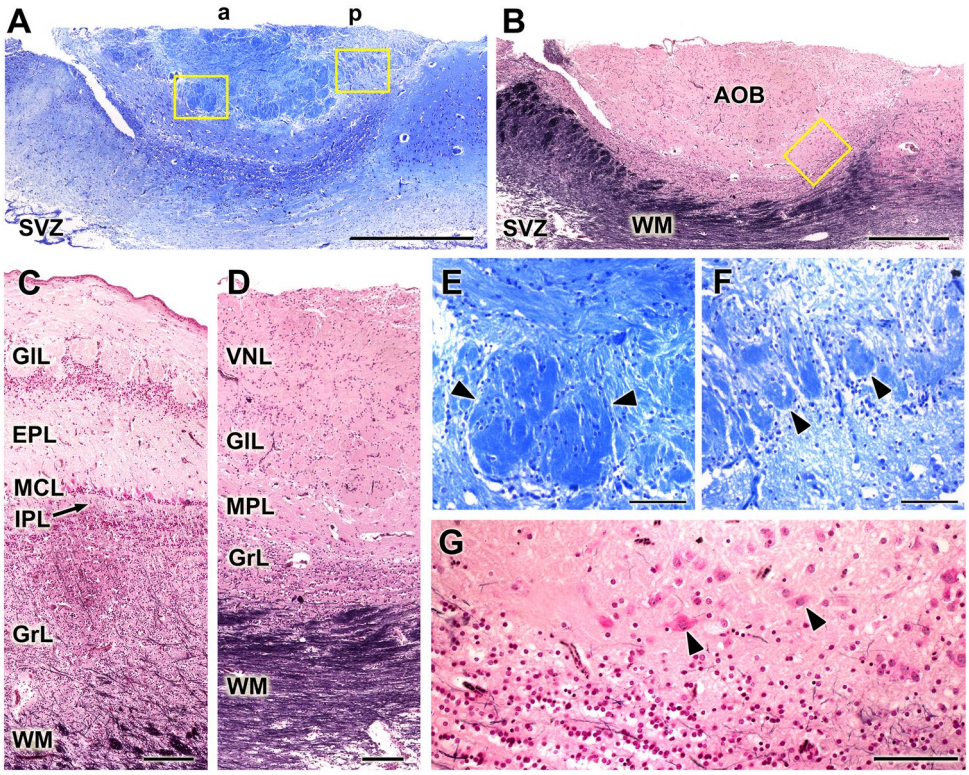

Fig. 9 Histological study of the Bennett's Wallaby AOB. **(A)** Low power sagittal section of the accessory olfactory bulb (AOB). Two zones are discriminated, an anterior (a) zone and a posterior (p) zone. **(B)** The Tolivia stain reveals the great development of the white matter (WM) pathways that leave the olfactory bulb (OB) from the main OB (MOB) and the AOB. **(C and D)** Comparison of the lamination between MOB (C) and the AOB (D). It is remarkable how, in the AOB, the plexiform (IPL) and mitral (MCL) layers are fused into a mitral-plexiform layer (MPL). **(E and F)** Higher magnification of the insets in A. A noticeable difference in size can be observed between the glomeruli (arrowheads) of both zones of the AOB: the anterior glomeruli (E) are much larger than the glomeruli on the posterior segment (F). **(G)** Higher magnification view of the inset in B, showing the deep layers of the AOB. Mitral cells (black arrow) are scattered in the MPL. EPL: External plexiform layer; GlL: Glomerular layer; GrL: Granular layer; IPL: Internal plexiform layer; MCL: Mitral cell layer; VNL: Vomeronasal nerve layer; SVZ: Subventricular zone. Stains: (A, E, F), Nissl; (B, C, D, G), Tolivia. Scale bars: (A, B) 1 mm; (C, D) 250 µm; (E, F, G) 100 µm

granular layers (Fig. 12E), and anti-GAP-43 labels both superficial layers, nervous and glomerular, in addition to the granular layer (Fig. 12G). However, it does not label the mitral-plexiform zone.

The calcium-binding proteins calbindin (CB) and calretinin (CR) are expressed along the whole VNS. In the AOB, both antibodies labeled the NVN and glomerular layer of the AOB in a diffuse and strong manner (Fig. 13A, B). Neither periglomerular nor mitral cells were immunopositive for either of these markers. Individual somas were observed for both markers in both the mitral-plexiform and granular layers of the AOB.

In the VNO neuroepithelium, both markers produced similar labeling patterns, characterized by the intense staining of the axonal bundles of the NVN and most of the neuroreceptor cells. The labeling was concentrated in the dendritic knobs and soma (Fig. 13C–F).

Discussion

The study of the expression patterns of the α-subunit of the Gi2 and Go proteins has been crucial to understanding the mechanisms of vomeronasal transduction. Gαi2 serves as a marker for V1R cells, whereas Gαo co-expresses with V2R cells. In the AOB, the NVNs express both G proteins according to a topographical anteroposterior zonation in which the anterior region expresses Gαi2 and the posterior region expresses Gαo. This segregated model is typical of species belonging to the orders Rodentia, Lagomorpha, Afrosoricida, and Didelphimorphia. A deterioration in the Gαo pathway is observed in species belonging to orders as diverse as Soricidae, Hyracoidea, Perissodactyla, Artiodactyla, Carnivora, and Primates. In these species, the NVN and its termination in the glomeruli only

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

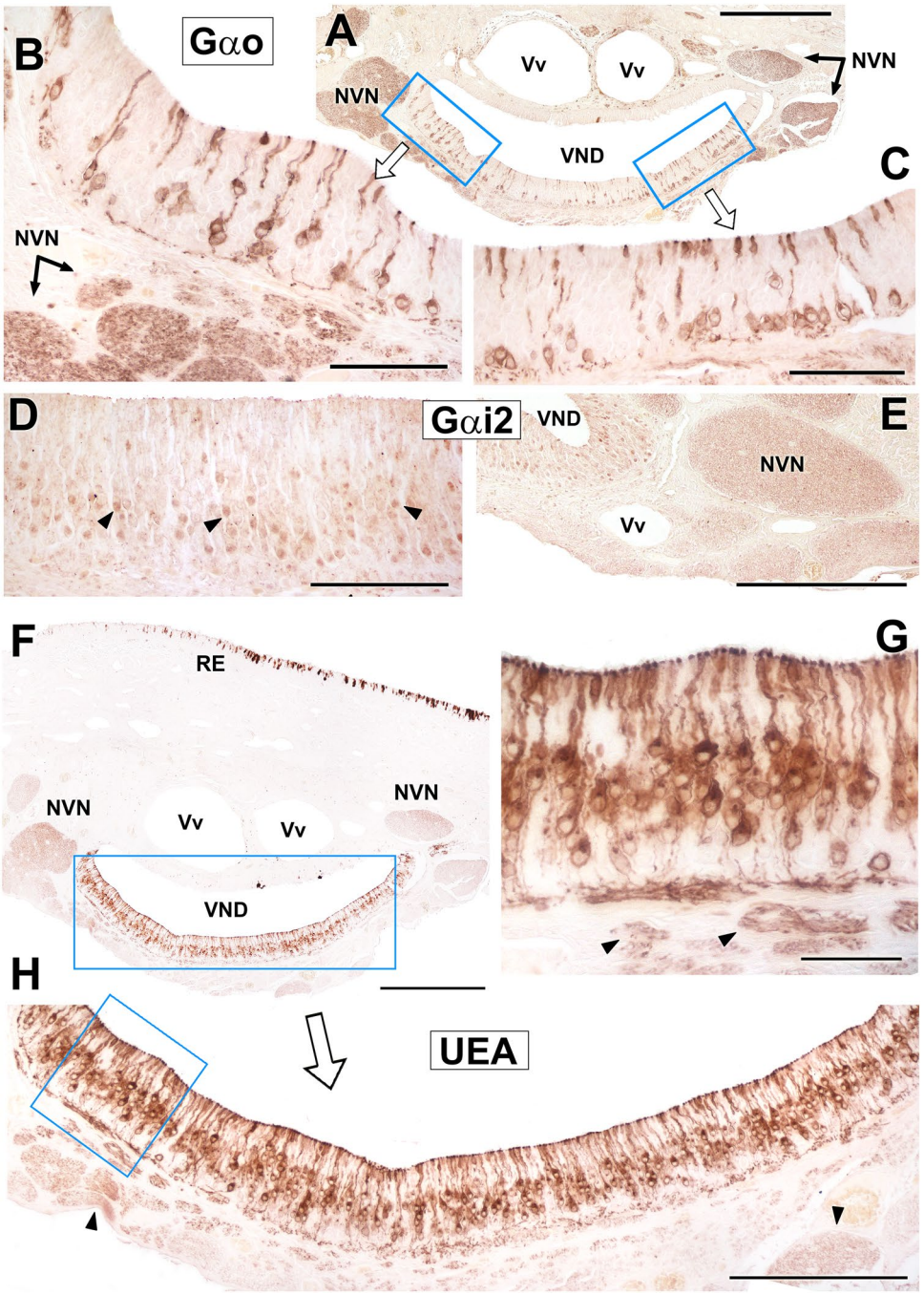

Fig. 10 Immunohistochemistry and lectin histochemistry of the Bennett's wallaby VNO. **(A)** Immunolabelling against Gαo in the vomeronasal sensory epithelium (SE). Strong positivity was observed in a subpopulation of neuroreceptor cells along the entire epithelium. **(B and C)** Insets in A show the labelling comprising the neuroreceptor cell somas, dendrites running to the luminal surface, and axons coursing towards the lamina propria. **(D, E)** Anti-Gαi2 immunolabelling is concentrated in the somas of the neuroreceptor cells (arrowheads). The positivity is confirmed at the level of the vomeronasal nerves (NVN). **(F–H)** Images at different magnifications showing histochemical labelling with *Ulex europaeus* agglutinin (UEA) lectin in the neuroepithelium. The labelling is concentrated in the somas and dendrites, as well as in the lamina propria nerve bundles (arrowheads in G and H). NVN: Vomeronasal nerve; RE: Respiratory epithelium; SE: Sensory epithelium; VND: Vomeronasal duct; Vv: Veins. Scale bars: (A, E, F) 500 µm; (H) 250 µm; (B, C, D) 100 µm; (G) 50 µm

express Gαi2, presenting a uniform model of vomeronasal transduction. This scenario was complicated by the 2012 publication of a study on the VNS in the tammar wallaby, *Notamacropus eugenii*, which unexpectedly revealed that this animal might constitute an alternative model of vomeronasal organization, with vomeronasal neuroreceptor cells along the VNO and AOB expressing only the Gαo protein (Schneider et al. 2012), indicating the existence of a third accessory olfactory type, intermediate to the segregated and uniform types previously described. However, the authors of the study in tammar wallaby warned that their findings should be taken with caution, as some of their observations prevented the drawing of definite conclusions. Very atypically for a uniform model of G protein subunit expression, the anti-Gαo protein was only expressed in a subpopulation of neuroreceptor cells in the vomeronasal epithelium rather than in the whole population of VR neurons. To explain this low number of Gαo-positive cells, the authors hypothesized a reduced affinity of the antibody used for the tammar Gαo; however,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

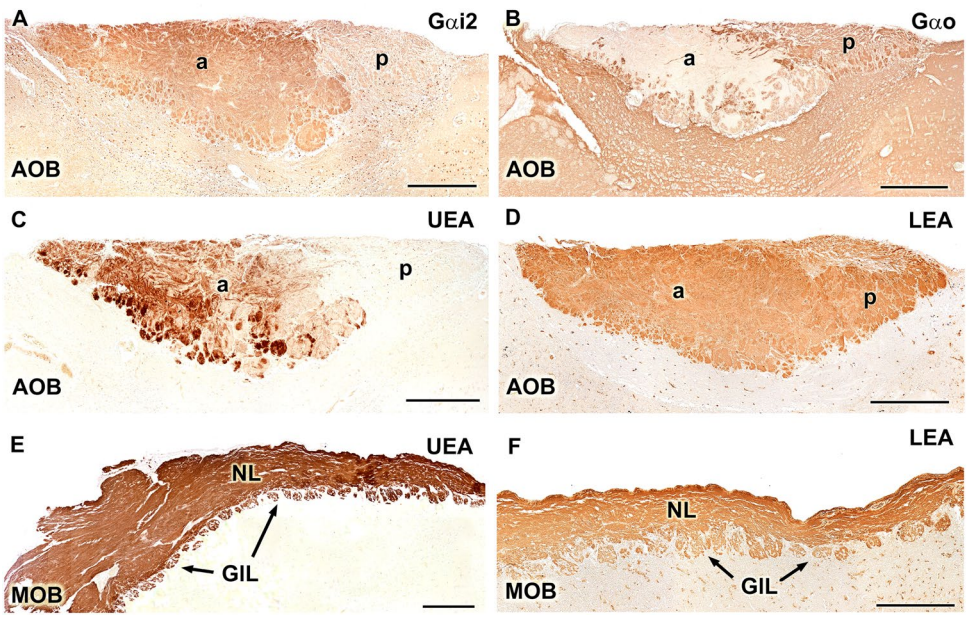

Fig. 11 Immunohistochemical and lectin-histochemical labelling of the Bennet's wallaby AOB. **(A)** Anti-Gαi_2 clearly delimits an anterior (+)/posterior (−) zonation in the superficial layers of the AOB. **(B)** Anti-Gαo delimits an anterior (−)/posterior (+) zonation. **(C and E)** *Ulex europaeus* agglutinin (UEA) lectin labelling confirms the zonation found with anti-Gαi_2. The glomerular and nerve layers of the main olfactory bulb (MOB) are equally positive for this marker (E). **(D and F)** *Lycopersicon esculentum* agglutinin (LEA) stains the superficial layers of the whole accessory olfactory bulb (AOB, D) and MOB (F).Scale bars: (A, B, C, D) 500 µm; (E, F) 250 µm

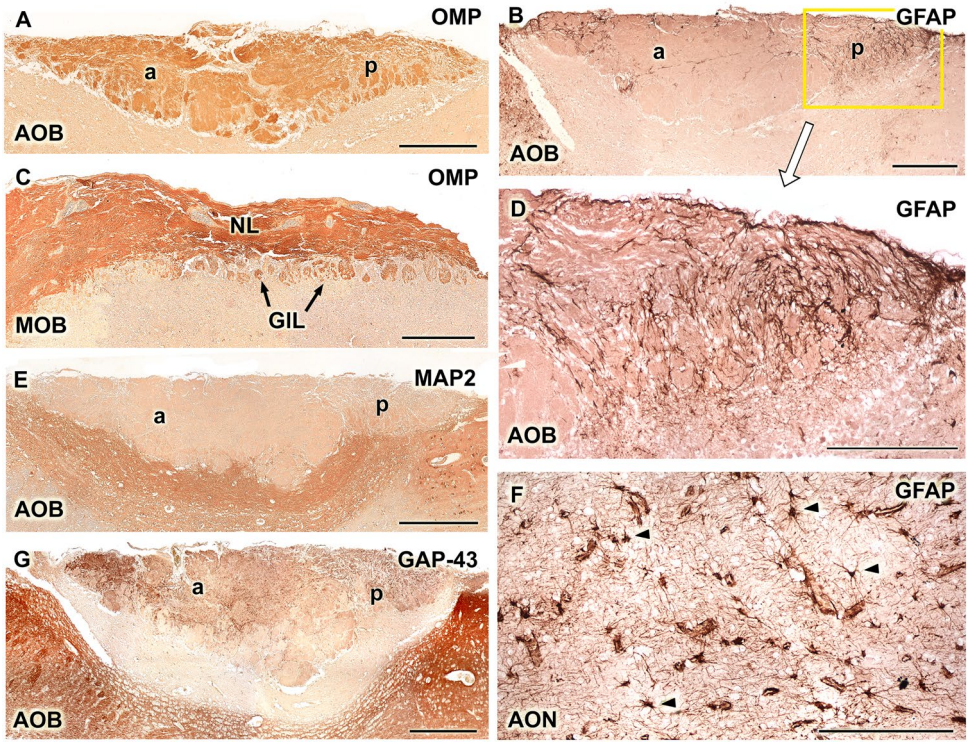

Fig. 12 Immunohistochemical labelling of the Bennett's wallaby AOB. **(A and C)** Anti-olfactory marker protein (OMP) stains the superficial layers of both the accessory olfactory bulb (AOB, A) and the main olfactory bulb (MOB, C). **(B, D, and F)** The anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) labelling is concentrated in the anterior and even more intensely in the posterior (enlarged in D) edges of the AOB. The fibrillar character of the labelling indicates that it corresponds to the ensheathing glia (D). Few astrocytes are observed, although these can be identified in the anterior olfactory nucleus, which serves as positive control**.** **(E)** Anti-microtubule-associated protein 2 (MAP-2) stains the deeper layers of the AOB: mitral-plexiform and granular. **(G)** Anti-growth-associated protein (GAP)-43 produces positive labelling in the VNL, GlL, and GrL strata. Scale bars: (A, B, E, G) 500 µm; (C, D,F) 250 µm

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

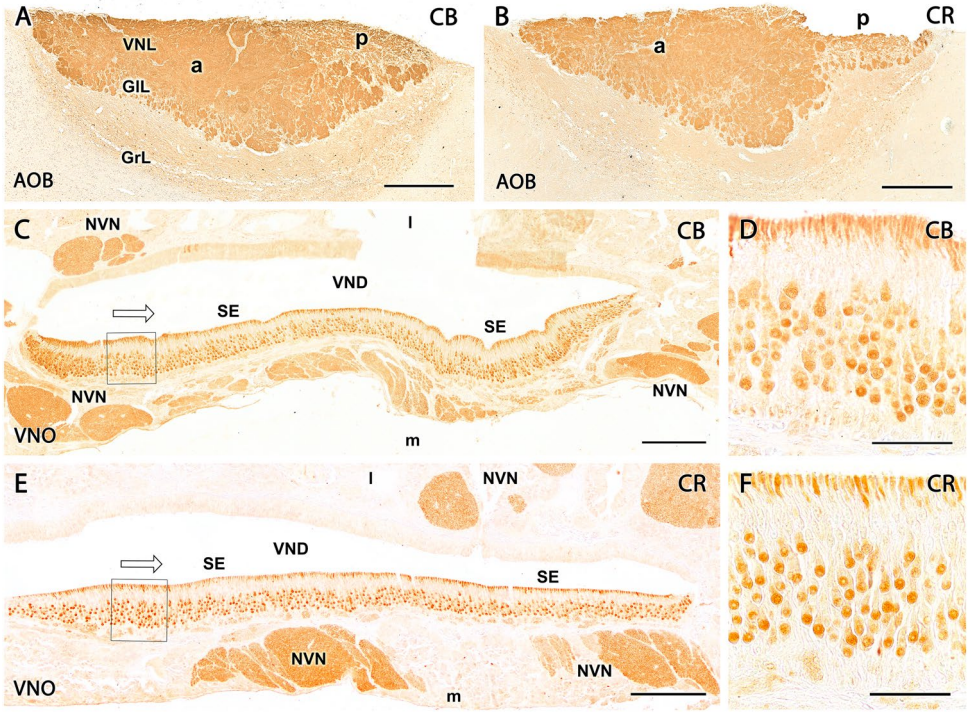

Fig. 13 Study of calcium-binding proteins in the Bennett's wallaby VNS. **(A)** Calbindin and **(B)** calretinin markers show immunopositivity in the neuropil of the nerve and glomerular layers of the AOB. **(C)** In wallaby VNO, anti-calbindin is strongly expressed in NVN and characteristically marks receptor neuroepithelial cells. **(D)** Enlargement of the box shown in C where anti-calbindin produces a label in the nucleus, soma, and dendrites of cells in the central area of the epithelium and less intensely marks some cells in the basal area. **(E)** In the case of calretinin, it produces a marking very similar to that shown by calbindin in the VNO, intensely marking the nerve bundles and **(F)** mainly the cells of the central stratum in the epithelium, although a slight marking is also observed in a certain population of basal cells. Scale bars: (A, B) 500 µm; (C, E) 200 µm; (D, F) 50 µm

no other examples of any similar selectivity deficits in response to the use of anti-Gαo antibodies have been described in the literature.

More critically, immunolabeling of the tammar wallaby AOB using anti-Gαo has only been demonstrated by this single study (Fig. 6E in Schneider et al. 2012). Their staining protocol resulted in very faint labeling, which was restricted to a very small area of the superficial layers of the AOB receiving projections from the vomeronasal neuroreceptor cells. In contrast, in all other studied species, in both the segregated and uniform models, both Gαo and Gαi2 antibodies are associated with positive immunolabeling that can be observed throughout the entire thickness of the superficial layers, including the NVN and glomerular layers. Regrettably, the authors do not specify the antibody employed that resulted in a Gαi2 immunonegative pattern in both the VNO and AOB. Neither the commercial source nor the antibody lot number was reported, precluding any comparisons with other studies of Gαi2 expression in the VNS using the same antibody.

To date, no further studies have been reported that either reinforces or rejects the potential existence of this third model of organization for the vomeronasal transduction pathways. Therefore, we have performed a morphofunctional study of the VNS of the Bennett's wallaby (*Notamacropus rufogriseus*) to characterize the expression patterns of G proteins in this species to shed light on the proposed presence of a third model of vomeronasal transduction in macropodids.

Our immunohistochemical study of G proteins in the Bennet's wallaby revealed a canonical immunohistochemical labeling pattern for both Gαi2 and Gαo in the VNO and AOB of all samples studied. Moreover, the pattern of labeling observed in the Bennett's wallaby vomeronasal neuroepithelium using anti-Gαo staining (Fig. 10A–C) was identical to that described for the tammar wallaby (Fig. 3A and B in Schneider et al. 2012), in which only a small fraction of neuroreceptor cells were labeled. The nuclei of these cells were distributed along the entire thickness of the neuroepithelium, with very strong staining in the somas and the knob-like structures protruding into the VNO lumen from the receptor cell endings. However, whereas Schneider et al. did not obtain positive immunolabeling with their anti-Gαi2 antibody in the VNO, we observed an abundant number of immunopositive cells in the neuroepithelium (Fig. 10D) using our anti-Gαi2 antibody. The strong immunopositivity identified in the vomeronasal axons in both the lamina

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

propria and the nasal mucosa confirmed the neuroreceptor nature of these cells (Fig. 10E).

By extending immunohistochemical characterization of G protein expression to the AOB, we were able to verify the existence of the anterior–posterior zonation pattern that is typical of mammalian species belonging to the segregated model. The vomeronasal axons reaching the anterior zone of the AOB only expressed Gαi2, whereas those reaching the posterior zone only expressed the Gαo subunit, and the immunolabeling of these two G proteins revealed a complementary pattern. Gαo positivity was also observed in the glomerular layer of the Gαi2-positive anterior zone, a layer that contains many dendritic projections from mitral and other neurons located in deeper layers of the anterior region, similar to the observations described by Takigami et al. (2004), Villamayor et al. (2018), and Torres et al. (2020). The observed Gαo-positivity is, therefore, likely due to the presence of projections from Gαo-positive cells located in the anterior part of the neuropil onto glomeruli found in this area; however, because these projections do not originate from vomeronasal axons, this anterior glomerular Gαo-positive labeling cannot be considered a justification for the uniform model. The employment of the UEA lectin provided additional evidence for the segregation of vomeronasal information in the wallaby, revealing the selective labeling of the anterior zone of the AOB. The affinity of the UEA lectin for the anterior AOB has been reported for all the species belonging to the segregated model in which this histochemical marker has been investigated, including hamster (Taniguchi et al. 1993), mouse (Salazar et al. 2001; Salazar and Sanchez-Quinteiro 2003; Kondoh et al. 2017a, b), rat (Salazar and Sanchez Quinteiro 1998), and capybara (Torres et al. 2020). However, studies using UEA lectin staining in species belonging to the uniform model, including pig (Salazar et al. 2000), cat (Salazar and Sanchez-Quinteiro 2011), and dog (Salazar et al. 2013), and studies that have utilized a very broad panel of lectins, as in the goat (Mogi et al. 2007), have not described any evidence of zonation in the AOB.

The expression patterns observed for both Gαi2 and Gαo proteins in the VNO neuroepithelium, the NVN, and the AOB, including the establishment of a clear zonation pattern that was confirmed by UEA lectin staining, contradict the existence of a hypothetical third model of vomeronasal information processing, as described by Schneider et al. (2012). Although Schneider et al. performed their study in the tammar wallaby, *Notamacropus eugenii*, whereas our study was performed in Bennett's wallaby, *Notamacropus rufogriseus*, this difference is unlikely to explain the observed differences in immunohistochemical labeling, as differences in both the structure and G protein expression patterns of the AOB have never been reported between species belonging to the same genus or family (Meisami and Bhatnagar 1998; Halpern and Martinez Marcos 2003).

Moreover, the main morphological and histological features of the VNS described for *Notamacropus eugenii* are indistinguishable from those found by us in *Notamacropus rufogriseus*. Thus, comparing the observations of Schneider et al. for the VNO (2008) and AOB (2012) of *M. eugenii* with our observations in *M. rufogriseus* reveals that both species share important aspects, such as the opening of the VNO to the nasopalatine duct, the semilunar shape of the VND, with the presence of a remarkable mushroom body, the layering and cellularity of the neuroreceptor epithelium, and the presence of many PAS-positive vomeronasal glands in the lateral parenchyma. Both species share a comparable arrangement of large blood vessels surrounding the VND along its medial and lateral planes, and a similar presence of profuse dorsal, medial, ventral, and ventrolateral unmyelinated innervation is described for both species (Fig. 3B in Schneider et al. 2008), transmitting the information collected by the vomeronasal sensory neuroepithelium to the AOB. This arrangement of vomeronasal axons in the parenchyma is very atypical and has not previously been described in the VNO of any other mammal species apart from these two Macropodidae.

In both species, all the nerve bundles leave the VNO through a dorsolateral opening in the vomeronasal capsule, which is cartilaginous in both species. Another feature common to the VNO of both macropodids, which was observed by Schneider et al. (2008) and Sanchez-Villagra (2001) in the tammar wallaby and which we have verified in our histological series characterizing Bennett's wallaby, is the failure of the caudal VNC enclose the entire VNO, such that the posterior portion of the VNO is free of surrounding cartilage. A similar finding has been reported for other marsupials, such as *Notoryctes* (Sweet 1904) and *Caenolestes* (Broom 1926).

The information available for the AOB of the tammar wallaby is limited to the study of its lamination using hematoxylin–eosin and Nissl stains and the expression pattern of Gα subunits (Schneider et al. 2012). Our work extends these histological observations through the additional use of Tolivia staining, which allows for the characterization of the AOB lamination with greater definition, including its relationship with the lateral olfactory tract and the organization of mitral cells, all of which appeared comparable in the Bennet's wallaby to species with highly developed AOB structures, such as rodents (Meisami and Bhatnagar 1998) and Lagomorpha (Villamayor et al. 2020). Similarly, our immunohistochemical study allowed for the characterization of UEA and LEA lectin affinity and the immunohistochemical characterization using various marker proteins, including OMP, MAP2, GAP43, and GFAP, which were performed for the first in this marsupial family.

The UEA labeling, we previously discussed as a differential marker for the anterior zone of the AOB, with a

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

distribution pattern analogous to that of Gαi2, is not specific to the VNS of the Bennett's wallaby, as staining of the superficial layers of the MOB was also observed, similar to the distribution observed in rodents, such as the capybara (Torres et al. 2020), or in pigs (Salazar et al. 2000). LEA lectin stains all mammals, which has been investigated in the vomeronasal and olfactory neuroepithelia (Park et al. 2012; Lee et al. 2016) and the nerve and glomerular layers of both the AOB and MOB compartments in the mouse (Salazar et al. 2001), sheep, pig (Salazar et al. 2000), and rabbit (Villamayor et al. 2020). In the wallaby, unlike UEA, LEA produces a labeling pattern without zonation, similar to the pattern observed for OMP, a marker of mature olfactory and vomeronasal cells (Bock et al. 2009), and identical to the LEA pattern observed in the rabbit AOB, a species in which the zonation determined by G proteins cannot be discriminated using LEA and OMP (Villamayor et al. 2020).

Anti-GAP-43 is one of the best-characterized markers of growing and regenerating neuronal processes (Ramakers et al. 1992) and was able to identify growing axons in the Bennet's wallaby AOB, with no difference observed between the anterior and posterior zones. However, the antibody against GFAP showed stronger immunolabeling of glial components in the posterior portion of the AOB relative to the anterior segment, a pattern that has not been previously reported for other studies of this marker in the mammalian AOB (Salazar et al. 1994, 2006) and should be examined in more detail in future studies.

CB and CR are expressed in the entire VNS, along the VNO neuroepithelium, the NVN, and AOB. For both markers, the immunostaining of the VNO comprises the soma and dendrites in a pattern similar to that described in the mouse (Kishimoto et al. 1993). Additionally, in rats, CR labels most of the neuroreceptors cells, whereas CB only labels a neuronal subpopulation (Jia and Halpern 2003). The distribution of CB and CR immunoreactivity in the Bennett's wallaby's AOB concentrates on the vomeronasal fibers and glomeruli in a pattern analogous to that found in other species, such as the rabbit (Villamayor et al. 2020) or the capybara (Torres et al. 2020). In the case of other marsupials, such as the opossum, striking differences in the labeling patterns for CB and CR in the AOB were observed compared with the pattern found in the wallaby. In the opossum AOB, CB-labeled neurons were found in all layers except the nerve layer and the periglomerular cells, whereas CR showed a pattern analogous to that found in the wallaby, although in opossum, CR also labels mitral cells and discriminates an anteroposterior zonation, with more intense staining in the posterior AOB than in the anterior AOB zone (Jia and Halpern 2004).

Overall, the VNS of the Bennett's wallaby shows a degree of differentiation and histochemical and neurochemical diversity comparable to species with greater VNS development. The existence of the third intermediate type in vomeronasal information processing reported in *Notamacropus eugenii* is not supported by our lectin-histochemical and immunohistochemical findings in *Notamacropus rufogriseus*. We confirm the presence of effective expression of the two primary VR families in the VNS of the Bennett's wallaby, and our contribution expands the morphological, histochemical, and immunohistochemical information available on the VNS of Macropodidae and marsupials in general.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1007/s00429-021-02425-2.

Acknowledgements The authors thank MARCELLE NATURE PARK (Outeiro de Rei, Spain) for providing the animals employed in this study.

Author contributions Conceptualization: MVT, IO-L, PS-Q; methodology: MVT, IO-L, PRV, AF, JLR, PS-Q; formal analysis and investigation: MVT, IO-L, PRV, PS-Q; writing—review and editing: MVT, IO-L, PS-Q; funding acquisition: PS-Q; supervision: PSQ.

Funding Open Access funding provided thanks to the CRUE-CSIC agreement with Springer Nature. This work was partially supported by a University of Santiago de Compostela Grant [1551-8179] to P.S.Q.

Availability of data and material Not applicable.

Code availability Not applicable.

Declarations

Conflict of interest The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Ethical approval All the animals employed in this study dead by natural causes.

Informed consent No human subject was used in this study.

Consent for publication Not applicable.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

References

Alroy J, Ucci AA, Goyal V, Woods W (1986) Lectin histochemistry of glycolipid storage diseases on frozen and paraffin-embedded tissue sections. J Histochem Cytochem 34:501–505. https://doi.org/10.1177/34.4.3081625

Berghard A, Buck LB (1996) Sensory transduction in vomeronasal neurons: evidence for G alpha o, G alpha i2, and adenylyl cyclase II as major components of a pheromone signaling cascade. J Neurosci 16:909–918. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-03-00909.1996

Bock P, Rohn K, Beineke A, Baumgärtner W, Wewetzer K (2009) Site-specific population dynamics and variable olfactory marker protein expression in the postnatal canine olfactory epithelium. J Anat 215:522–535. https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2009.01147.x

Broom R (1926) On the organ of Jacobson and some other structures in the nose of Caenolestes. Proc Zool Soc 1926:419–424. https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1926.tb08104.x

Chamero P, Marton TF, Logan DW, Flanagan K, Cruz JR, Saghatelian A, Cravatt BF, Stowers L (2007) Identification of protein pheromones that promote aggressive behaviour. Nature 450:899–902. https://doi.org/10.1038/nature05997

Cross SKJ, Martin YH, Salia S, Gamba I, Major CA, Hassan S, Parsons KA, Swift-Gallant A (2021) Puberty is a critical period for vomeronasal organ mediation of socio-sexual behavior in mice. Front Behav Neurosci 14:606788. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.606788

Demir E, Li K, Bobrowski-Khoury N, Sanders JI, Beynon RJ, Hurst JL, Kepecs A, Axel R (2020) The pheromone darcin drives a circuit for innate and reinforced behaviours. Nature 578:137–141. https://doi.org/10.1038/s41586-020-1967-8

Dulac C, Axel R (1995) A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. Cell 63:195–206. https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90161-2

Grus WE, Shi P, Zhang YP, Zhang J (2005) Dramatic variation of the vomeronasal pheromone receptor gene repertoire among five orders of placental and marsupial mammals. Proc Natl Acad Sci USA 102:5767–5772. https://doi.org/10.1073/pnas.0501589102

Halpern M, Martinez-Marcos A (2003) Structure and function of the vomeronasal system: an update. Prog Neurobiol 70:245–318. https://doi.org/10.1016/s0301-0082(03)00103-5

Halpern M, Shapiro LS, Jia C (1995) Differential localization of G proteins in the opossum vomeronasal system. Brain Res 677:157–161. https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00159-n

Herrada G, Dulac C (1997) A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution. Cell 90:763–773. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80536-x

Ibarra-Soria X, Levitin MO, Logan DW (2014) The genomic basis of vomeronasal-mediated behaviour. Mamm Genome 25:75–86. https://doi.org/10.1007/s00335-013-9463-1

Isogai Y, Si S, Pont-Lezica L, Tan T, Kapoor V, Murthy VN, Dulac C (2011) Molecular organization of vomeronasal chemoreception. Nature 478:241–245. https://doi.org/10.1038/nature10437

Jia C, Halpern M (1996) Subclasses of vomeronasal receptor neurons: differential expression of G proteins (Giα2 and Goα) and segregated projections to the accessory olfactory bulb. Brain Res 719:117–128. https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00110-2

Jia C, Halpern M (2003) Calbindin D28K immunoreactive neurons in vomeronasal organ and their projections to the accessory olfactory bulb in the rat. Brain Res 977:261–269. https://doi.org/10.1016/s0006-8993(03)02693-3

Jia C, Halpern M (2004) Calbindin d28k, parvalbumin, and calretinin immunoreactivity in the main and accessory olfactory bulbs of the gray short-tailed opossum, Monodelphis domestica. J Morphol 259:271–280. https://doi.org/10.1002/jmor.10166

Katreddi RR, Forni PE (2021) Mechanisms underlying pre-and postnatal development of the vomeronasal organ. Cell Mol Life Sci 78:5069–5082. https://doi.org/10.1007/s00018-021-03829-3

Keverne EB (2002) Pheromones, vomeronasal function, and gender-specific behavior. Cell 108:735–738. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00687-6

Kishimoto J, Keverne EB, Emson PC (1993) Calretinin, calbindin-D28k and parvalbumin-like immunoreactivity in mouse chemoreceptor neurons. Brain Res 610:325–329. https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)91417-q

Kondoh D, Kamikawa A, Sasaki M, Kitamura N (2017a) Localization of α1-2 fucose glycan in the mouse olfactory pathway. Cells Tissue Organs 203:20–28. https://doi.org/10.1159/000447009

Kondoh D, Watanabe K, Nishihara K, Ono YS, Nakamura KG, Yuhara K, Tomikawa S, Sugimoto M, Kobayashi S, Horiuchi N, Kobayashi Y, Sasaki M, Kitamura N (2017b) Histological properties of main and accessory olfactory bulbs in the common hippopotamus. Brain Behav Evol 90:224–231. https://doi.org/10.1159/000479180

Lee KH, Park C, Kim J, Moon C, Ahn M, Shin T (2016) Histological and lectin histochemical studies of the vomeronasal organ of horses. Tissue Cell 48:361–369. https://doi.org/10.1016/j.tice.2016.05.002

Martín-Sánchez A, McLean L, Beynon RJ, Hurst JL, Ayala G, Lanuza E, Martínez-García F (2015) From sexual attraction to maternal aggression: when pheromones change their behavioural significance. Horm Behav 68:65–76. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.08.007

Matsunami H, Buck LB (1997) A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals. Cell 90:775–784. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80537-1

Meisami E, Bhatnagar KP (1998) Structure and diversity in mammalian accessory olfactory bulb. Microsc Res Tech 43:476–499. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19981215)43:6%3c476:AID-JEMT2%3e3.0.CO;2-V

Mogi K, Sakurai K, Ichimaru T, Ohkura S, Mori Y, Okamura H (2007) Structure and chemical organization of the accessory olfactory bulb in the goat. Anat Rec 290:301–310. https://doi.org/10.1002/ar.20505

Müller-Schwarze D (2006) Chemical ecology of vertebrates. Cambridge University Press, Cambridge.https://doi.org/10.1017/CBO9780511607233

Ortiz-Leal I, Torres MV, Villamayor PR, López-Beceiro A, Sanchez-Quinteiro P (2020) The vomeronasal organ of wild canids: the fox (Vulpes vulpes) as a model. J Anat 237:890–906. https://doi.org/10.1111/joa.13254

Papes F, Logan DW, Stowers L (2010) The vomeronasal organ mediates interspecies defensive behaviors through detection of protein pheromone homologs. Cell 141:692–703. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.037

Pallé A, Zorzo C, Luskey VE, McGreevy KR, Fernández S, Trejo JL (2019) Social dominance differentially alters gene expression in the medial prefrontal cortex without affecting adult hippocampal neurogenesis or stress and anxiety-like behavior. The FASEB Journal 33:6995–7008. https://doi.org/10.1096/fj.201801600R

Park J, Lee W, Jeong C, Kim H, Taniguchi K, Shin T (2012) Developmental changes affecting lectin binding in the vomeronasal organ of domestic pigs, Sus scrofa. Acta Histochem 114:24–30. https://doi.org/10.1016/j.acthis.2011.02.001

Powers JB, Winans SS (1975) Vomeronasal organ: critical role in mediating sexual behavior of the male hamster. Science 187:961–963. https://doi.org/10.1126/science.1145182

Ramakers GJ, Verhaagen J, Oestreicher AB, Margolis FL, Henegouwen PMB, Gispen WH (1992) Immunolocalization of B-50

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(GAP-43) in the mouse olfactory bulb: predominant presence in preterminal axons. J Neurocytol 21:853–869. https://doi.org/10.1007/BF01191683
Ryba NJP, Tirindelli R (1997) A new multigene family of putative pheromone receptors. Neuron 19:371–379. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80946-0
Salazar I, Sanchez-Quinteiro P (1998) Lectin binding patterns in the vomeronasal organ and accessory olfactory bulb of the rat. Anat Embryol 198:331–339. https://doi.org/10.1007/s004290050188
Salazar I, Sanchez-Quinteiro P (2003) Differential development of binding sites for four lectins in the vomeronasal system of juvenile mouse: from the sensory transduction site to the first relay stage. Brain Res 979:15–26. https://doi.org/10.1016/s0006-8993(03)02835-x
Salazar I, Sanchez-Quinteiro P (2011) A detailed morphological study of the vomeronasal organ and the accessory olfactory bulb of cats. Microsc Res Tech 74:1109–1120. https://doi.org/10.1002/jemt.21002
Salazar I, Cifuentes JM, Sanchez-Quinteiro P, Garcia Caballero T (1994) Structural, morphometric, and immunohistological study of the accessory olfactory bulb in the dog. Anat Rec 240:277–285. https://doi.org/10.1002/ar.1092400216
Salazar I, Sanchez-Quinteiro P, Lombardero M, Cifuentes JM (2000) A descriptive and comparative lectin histochemical study of the vomeronasal system in pigs and sheep. J Anat 196:15–22. https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2000.19610015.x
Salazar I, Sanchez-Quinteiro P, Lombardero M, Cifuentes JM (2001) Histochemical identification of carbohydrate moieties in the accessory olfactory bulb of the mouse using a panel of lectins. Chem Senses 26:645–652. https://doi.org/10.1093/chemse/26.6.645
Salazar I, Sanchez-Quinteiro P, Cifuentes JM, Troconiz PF (2006) General organization of the perinatal and adult accessory olfactory bulb in mice. Anat Rec 288:1009–1025. https://doi.org/10.1002/ar.a.20366
Salazar I, Sanchez-Quinteiro P, Alemañ N, Cifuentes JM, Troconiz PF (2007) Diversity of the vomeronasal system in mammals: the singularities of the sheep model. Microsc Res Tech 70:752–762. https://doi.org/10.1002/jemt.20461
Salazar I, Cifuentes JM, Sanchez-Quinteiro P (2013) Morphological and immunohistochemical features of the vomeronasal system in dogs. Anat Rec 296:146–155. https://doi.org/10.1002/ar.22617
Sanchez-Villagra MR (2001) Ontogenetic and phylogenetic transformations of the vomeronasal complex and nasal floor elements in marsupial mammals. Zool J Linnean Soc 131:459–479. https://doi.org/10.1006/zjls.2000.0271
Schneider NY, Fletcher TP, Shaw G, Renfree MB (2008) The vomeronasal organ of the tammar wallaby. J Anat 213:93–105. https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2008.00933.x
Schneider NY, Fletcher TP, Shaw G, Renfree MB (2012) Gαo expression in the vomeronasal organ and olfactory bulb of the tammar wallaby. Chem Senses 37:567–577. https://doi.org/10.1093/chemse/bjs040
Shinohara H, Asano T, Kato K (1992) Differential localization of G-proteins Gi and Go in the accessory olfactory bulb of the rat. J Neurosci 4:1275–1279. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.12-04-01275.1992
Stoyanov GS, Sapundzhiev NR, Tonchev AB (2021) The vomeronasal organ: history, development, morphology, and functional neuroanatomy. Handb Clin Neurol 182:283–291. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819973-2.00020-4
Suarez R, Mpodozis J (2009) Heterogeneities of size and sexual dimorphism between the subdomains of the lateral-innervated accessory olfactory bulb (AOB) of *Octodon degus* (Rodentia: Hystricognathi). Behav Brain Res 198:306–312. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.11.009
Suarez R, Villalón A, Künzle H, Mpodozis J (2009) Transposition and Intermingling of Galphai2 and Galphao afferences into single vomeronasal glomeruli in the Madagascan lesser Tenrec *Echinops telfairi*. PLoS ONE 4:e8005. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008005
Suarez R, Fernandez-Aburto P, Manger PR, Mpodozis J (2011a) Deterioration of the Gαo vomeronasal pathway in sexually dimorphic mammals. PLoS ONE 6:e26436. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026436
Suarez R, Santibáñez R, Parra D, Coppi AA, Abrahão LMB, Sasahara THC, Mpodozis J (2011b) Share and differential traits in the accessory olfactory bulb of caviomorph rodents with particular reference to the semiaquatic capybara. J Anat 218:558–565. https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2011.01357.x
Sweet G (1904) Contributions to our knowledge of the anatomy of Notoryctes typhlops, Stirling. Parts I and II. Proc R Soc Victoria 17:76–111. https://doi.org/10.1242/jcs.s2-50.200.547
Takigami S, Mori Y, Ichikawa M (2000) Projection pattern of vomeronasal neurons to the accessory olfactory bulb in goats. Chem Senses 25:387–393. https://doi.org/10.1093/chemse/25.4.387
Takigami S, Mori Y, Tanioka Y, Ichikawa M (2004) Morphological evidence for two types of mammalian vomeronasal system. Chem Senses 29:301–310. https://doi.org/10.1093/chemse/bjh032
Taniguchi K, Nii Y, Ogawa K (1993) Subdivisions of the accessory olfactory bulb, as demonstrated by lectin-histochemistry in the golden hamster. Neurosci Lett 158:185–188. https://doi.org/10.1016/0304-3940(93)90260-r
Torres MV, Ortiz-Leal I, Villamayor PR, Ferreiro A, Rois JL, Sanchez-Quinteiro P (2020) The vomeronasal system of the newborn capybara: a morphological and immunohistochemical study. Sci Rep 10:13304. https://doi.org/10.1038/s41598-020-69994-w
Villamayor PR, Cifuentes JM, Fdez-de-Troconiz P, Sanchez-Quinteiro P (2018) Morphological and immunohistochemical study of the rabbit vomeronasal organ. J Anat 233:814–827. https://doi.org/10.1111/joa.12884
Villamayor PR, Cifuentes JM, Quintela L, Barcia R, Sanchez-Quinteiro P (2020) Structural, morphometric and immunohistochemical study of the rabbit accessory olfactory bulb. Brain Struct Funct 225:203–226. https://doi.org/10.1007/s00429-019-01997-4
Villamayor PR, Robledo D, Fernández C, Gullón J, Quintela L, Sánchez-Quinteiro P, Martínez P (2021) Analysis of the vomeronasal organ transcriptome reveals variable gene expression depending on age and function in rabbits. Genomics 113:2240–2252. https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.05.007
Wyatt TD (2014) Pheromones and animal behavior: chemical signals and signatures, 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge. https://doi.org/10.1017/CBO9781139030748
Wysocki CJ, Lepri JJ (1991) Consequences of removing the vomeronasal organ. J Steroid Biochem Mol Biol 39:661–669. https://doi.org/10.1016/0960-0760(91)90265-7
Xia B, Yan Y, Baron M, Wagner F, Barkley D, Chiodin M, Kim SY, Keefe DL, Alukal JP, Boeke JD, Yanai I (2020) Widespread transcriptional scanning in the testis modulates gene evolution rates. Cell 180:248-262.e21. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.12.015
Young JM, Massa HF, Hsu L, Trask BJ (2010) Extreme variability among mammals V1R gene families. Genome Res 20:10–18. https://doi.org/10.1101/gr.098913.109

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.3 PUBLICACIÓN NÚMERO 3

Torres, M. V., Ortiz-Leal, I., Ferreiro, A., Rois, J. L., & Sanchez-Quinteiro, P. Neuroanatomical and immunohistological study of the main and accessory olfactory bulbs of the meerkat (*Suricata suricatta*). *Animals* 12(1), 91 (2022).

https://doi.org/10.3390/ani12010091

Revista: Animals

Año de publicación: 2022

Editorial: MDPI

ISSN: 2076-2615

Citas en Google Scholar: 5

Índices de calidad de la revista:

Factor de impacto (2022): 3.0

Factor de impacto de 5 años (2022): 3.2

Categorías (2022):

Agriculture, Dairy & Animal Science Q1 (D1) (12/62)

Veterinary Sciences Q1 (D1) (13/143)

Contribución del doctorando: M. V. T. diseñó la investigación, realizó el trabajo, analizó y discutió los resultados y escribió el artículo.

Autorización de la revista/editorial: Contenido reproducido bajo las condiciones de Copyright (2022) Creative Commons Attribution (CC BY 4.0).

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

animals

MDPI

Article

Neuroanatomical and Immunohistological Study of the Main and Accessory Olfactory Bulbs of the Meerkat (*Suricata suricatta*)

Mateo V. Torres [1,†], Irene Ortiz-Leal [1,†], Andrea Ferreiro [2], José Luis Rois [2] and Pablo Sanchez-Quinteiro [1,*]

[1] Department of Anatomy, Animal Production and Clinical Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary, University of Santiago de Compostela, Av. Carballo Calero s/n, 27002 Lugo, Spain; Mateovazquez.torres@usc.es (M.V.T.); irene.ortiz.leal@usc.es (I.O.-L.)
[2] Marcelle Nature Park, Outeiro de Rei, 27154 Lugo, Spain; servet@marcellenatureza.com (A.F.); servet.marcellenatureza@gmail.com (J.L.R.)
* Correspondence: pablo.sanchez@usc.es
† These authors contributed equally to this work.

Simple Summary: In wild mammals, chemical senses are crucial to survival, but sensory system information is lacking for many species, including the meerkat (*Suricata suricatta*), an iconic mammal with a marked social hierarchy that has been ambiguously classified in both canid and felid families. We studied the neuroanatomical basis of the meerkat olfactory and accessory olfactory bulbs, aiming to provide information on the relevance of both systems to the behaviors of this species and contributing to improving its taxonomic classification. The accessory olfactory bulb serves as the integration center of vomeronasal information. When examined microscopically, the accessory olfactory bulb of the meerkat presents a lamination pattern more defined than observed in dogs and approaching the pattern described in cats. The degree of lamination and development in the meerkat main olfactory bulb is comparable to the general pattern observed in mammals but with numerous specific features. Our study supports the functionality of the olfactory and vomeronasal integrative centers in meerkats and places this species within the suborder Feliformia. Our study also confirms the importance of chemical signals in mediating the social behaviors of this species and provides essential neuroanatomical information for understanding the functioning of their chemical senses.

Abstract: We approached the study of the main (MOB) and accessory olfactory bulbs (AOB) of the meerkat (*Suricata suricatta*) aiming to fill important gaps in knowledge regarding the neuroanatomical basis of olfactory and pheromonal signal processing in this iconic species. Microdissection techniques were used to extract the olfactory bulbs. The samples were subjected to hematoxylin-eosin and Nissl stains, histochemical (*Ulex europaeus* agglutinin, *Lycopersicon esculentum* agglutinin) and immunohistochemical labelling (Gαo, Gαi2, calretinin, calbindin, olfactory marker protein, glial fibrillary acidic protein, microtubule-associated protein 2, SMI-32, growth-associated protein 43). Microscopically, the meerkat AOB lamination pattern is more defined than the dog's, approaching that described in cats, with well-defined glomeruli and a wide mitral-plexiform layer, with scattered main cells and granular cells organized in clusters. The degree of lamination and development of the meerkat MOB suggests a macrosmatic mammalian species. Calcium-binding proteins allow for the discrimination of atypical glomerular subpopulations in the olfactory limbus between the MOB and AOB. Our observations support AOB functionality in the meerkat, indicating chemosensory specialization for the detection of pheromones, as identified by the characterization of the V1R vomeronasal receptor family and the apparent deterioration of the V2R receptor family.

Keywords: meerkat; *Suricata suricatta*; Herpestidae; Carnivora; olfactory system; vomeronasal system; olfactory bulb; immunohistochemistry; lectins; G proteins; atypical glomeruli

check for updates

Citation: Torres, M.V.; Ortiz-Leal, I.; Ferreiro, A.; Rois, J.L.; Sanchez-Quinteiro, P. Neuroanatomical and Immunohistological Study of the Main and Accessory Olfactory Bulbs of the Meerkat (*Suricata suricatta*). *Animals* **2022**, *12*, 91. https://doi.org/10.3390/ani12010091

Academic Editor: José Raduan Jaber Mohamad

Received: 17 December 2021
Accepted: 30 December 2021
Published: 31 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

The dense network of chemosignals recognized by the olfactory system enables the animal to form a multidimensional rendering of its environment [1], information often used to modulate basic activities, such as reproduction, food-seeking, and the adoption of social, maternal, and sexual behaviors [2]. This environmental rendering is not static but dynamic in space and time. The physicochemical characteristics of detected signals, such as volatility and permanence in time and dispersion in space, can enhance the amount of information provided by each signal [3]. Identifying a diverse plethora of molecules associated with such a diverse range of solubilities and volatilities requires a great diversity of chemoreceptors, which have been identified phylogenetically in the olfactory rosette of fish [4] and are highly conserved and expanded in mammals [5].

The nasal cavity harbors several olfactory subsystems [6,7], including two sophisticated nasal chemosensory organs: the main olfactory epithelium (MOE) and the vomeronasal organ (VNO). Both organs are distinguished by the anatomical distributions of their sensory neurons, the types of receptors they express, the signaling mechanisms they employ to transduce chemosensory stimuli, the types of chemosensory stimuli they detect, and the axonal targets of their sensory neurons in the rhinencephalon [8].

The main olfactory system (MOS) is composed of ciliated olfactory sensory neurons (OSNs) located in the MOE lining the ethmoid turbinates and the main olfactory bulb (MOB), which represents the first integrative center for the information delivered by OSNs. The MOS is a broadly tuned odor sensor that responds to thousands of volatile chemicals carrying information on the state of food, detects pathogens, and identifies the presence of prey, predators or conspecifics [9]. Each OSN expresses a single G protein-coupled olfactory receptor (OR) from a pool of hundreds. All axons expressing the same OR, despite being randomly distributed in the MOE, project onto one or a few topographically invariant glomeruli on each side of the MOB [10].

The vomeronasal system (VNS) consists of microvillar vomeronasal sensory neurons in the neuroepithelium of the VNO [11] and the accessory olfactory bulb (AOB), where these neurons project [12]. The vomeronasal neurons are narrowly tuned sensory neurons that detect a range of small, natural ligands present in the exocrine secretions of conspecifics. The VNS is essential for the detection of both kairomones [13,14] and nonvolatile pheromones, which are involved in maternal recognition [15] and nonconscious sociosexual behaviors [16,17]. VNO neurons expressing the same vomeronasal receptor (VR) project axons to 10 to 30 distinct AOB glomeruli [18,19]. Located in the dorsocaudal region of the olfactory bulb (OB) and much smaller than the MOB, the AOB is usually well-differentiated and functionally independent from the MOB [20].

Although both the MOS and VNS present a degree of overlap in the stimuli they detect and the effects that they mediate [21,22], the rapid evolution of receptor genes is specific to the VNS [23]. The high degree of divergence among VR genes [24] differs from the general pattern of evolutionary conservation observed among olfactory receptors in the MOS [25]. The molecular diversity of the VNS is also reflected by a wide range of morphological heterogeneity, especially in terms of size, lamination, and the presence or absence of the AOB [26], which can make the interspecies extrapolation of information concerning the anatomical and histological features of the VNS very risky [27].

The meerkat (*Suricata suricatta*) is a gregarious carnivore of the suborder Feliformia, which includes species such as cats, hyenas, mongooses, and civets. In the past, the meerkat was classified within the Viverridae family, but in 1993, the meerkat was reclassified into the Herpestidae family due to the identification of new genetic similarities identified between meerkats and Herpestidae [28]. Meerkats live in semiarid environments in despotic groups of 2 to 50 individuals [29]. The dominant pair monopolizes reproduction, leading to a high level of intrasexual conflict, particularly among females, as the dominant female commonly evicts the eldest subordinate and other females during the late stages of pregnancy [30]. Males are the dispersing sex, leaving their natal groups at approximately 2 years of age [31]. Although most members of the suborder Feliformia are considered carnivores, some

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Herpestidae, such as the meerkat, are omnivores. The meerkat diet is primarily composed of arthropods, small-bodied mammals, and other vertebrates [32].

The complex social organization of meerkats suggests a high degree of morphological development for the MOS and VNS; however, to our knowledge, no information is available regarding the neuroanatomy of either the vomeronasal or olfactory systems of the meerkat. Behavioral studies indicate that meerkats are able to use olfactory signals when foraging [33,34], and their sense of smell appears to be specialized for the recognition of specific sociosexually relevant odors. Similarly, olfactory signals appear to play crucial roles in suppressing subordinate reproduction [35], establishing territorial areas, maintaining mate bonds [36], and perpetuating the social hierarchy [37]. Exocrine secretions released from the meerkat anal sac provide chemical information regarding sex, age, and the hierarchy within the social group [38,39], allowing for discrimination between relatives and nonrelatives [40]. In addition to a wide repertoire of scent-marking behaviors [41], meerkats display a flehmen response [33], which is indicative of a functional VNS. Similarly, both wild and captive meerkats can distinguish feces derived from carnivores and herbivores based on olfactory signals [31] and use predator cues, such as urine, to assess the level of danger associated with specific circumstances [42].

The relevance of chemical communication in meerkats indicates the importance of obtaining accurate neuroanatomical information regarding the structures of the meerkat MOS and VNS, which can be contrasted with available information for domestic carnivores, such as the cat [43] and dog [44,45]; wild carnivores, such as the African wild dog [46]; and with species belonging to the order Pholidota, a sister order to Carnivora, such as the pangolin [47]. We performed a comprehensive morphological, histological, and immunohistochemical study of meerkats with the aim of characterizing the neuroanatomical features of the first neural integrative centers of olfactory and vomeronasal information, the OB, and its main and accessory components.

2. Materials and Methods

Through a collaboration with Marcelle Nature Park (Outeiro de Rei, Spain), we were provided with three adult male meerkats (*Suricata suricatta*) for use in this study. The samples were collected after the animals' death due to natural causes. No more than 8 h elapsed between the death of the animals and their processing.

2.1. Sample Extraction

To perform the complete extraction of the brain, we began by making a longitudinal incision in the skin of the skull to facilitate the removal of the skin and underlying muscle planes. The cranial bones were then removed with the help of a rotatory saw and a gouge forceps, leaving the cerebral hemispheres accessible. The next step was the careful removal of the olfactory bulbs from their hidden location in the ethmoidal fossa. These are particularly delicate, and additionally, the olfactory and vomeronasal nerves, which pass through the lamina cribrosa of the ethmoid, anchor them firmly to the dura mater. The bony walls of the fossa were removed while the olfactory nerves were severed. Then the optic nerves, the internal carotid arteries, the pituitary stalk and the cranial nerves that emerge on either side of the brainstem were cut leaving the brain free. The whole brain was fixed with freshly prepared Bouin's liquid. Bouin's fixative is especially recommended for the study of the nervous system due to its high tissue penetration and because it preserves the structure of soft and delicate tissues [48], which facilitates further processing. After 24 h, the samples were introduced in 70% alcohol. This procedure was followed in two of the animals. In the third one, the sample was directly fixed in formaldehyde, the nasal cavity was cut transversely to observe the topography of the vomeronasal organ, and the anterior part of the skull was removed so that, after removing the frontal lobes, the olfactory bulbs could be examined in situ.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.2. Sample Processing for Histological Study

The olfactory bulbs were embedded in paraffin, cut in a rotary microtome at 8 µm in thickness and mounted onto gelatin-coated slides. The whole olfactory bulbs were serially sectioned in both sagittal and transversal planes. This allowed us to identify the much smaller accessory olfactory bulb. To visualize the different tissue components, we employed hematoxylin-eosin (HE) as a general staining and Nissl stain to visualize the soma and the beginning of the neuronal processes. In both specimens the results were comparable both structurally and in terms of immunohistochemical pattern.

2.3. Immunohistochemical Labelling (IHQ)

The immunohistochemical study covered a selected number of antibodies, which provide useful information on both MOS and VNS morphofunctional features. Antibodies against Gαi2 and Gαo allowed us to determine which pheromone receptor families—V1R [49] or V2R [50], respectively—are expressed in the VNS. The mitral cells, primary neural elements of the AOB, were labelled with antibodies against the microtubule-associated protein 2 (MAP-2) [51] and against SMI-32, marker of neurofilament proteins [52] expressed in the mitral cells of the OB of some therian mammals [53]. Neuronal growth was studied by employing antigrowth-associated protein 43 (GAP-43) [54]. The maturity of the system was determined using anti-olfactory marker protein (OMP) [55]. The calcium-binding proteins calbindin (CB) and calretinin (CR) were used to identify neuronal subpopulations [56]. Astrocytes and ensheathing cells were identified by an antibody against glial fibrillary acidic protein (GFAP) [57].

After deparaffining and rehydrating the samples, the procedure was as follows: (i) The slides were left for 10 min in a 3% hydrogen peroxide solution in distilled water. (ii) Nonspecific unions were blocked in the normal horse serum included in the ImmPRESS Anti-Rabbit and Anti-Mouse Kit from Vector Labs (Burlington, NJ, USA). Subsequently, (iii) the primary antibody was added at the corresponding dilution and the preparations were incubated overnight in a humid chamber at 4 °C. In any case antigen retrieval procedures were performed. The following morning, (iv) the corresponding secondary antibody (ImmPRESS Kit; view Table 1) was incubated for 30 min. Finally, (v) after rinsing in buffer (pH 7.6) for 10 min, (vi) the reaction was visualized by incubation in a 0.05% 3,3′-diaminobenzidine (DAB) solution and a 0.003% H_2O_2 solution, in 0.2 M Tris-HCl buffer. DAB chromogen developed into a brown precipitate. For several of the antibodies employed, counterstaining was performed with haematoxylin.

Table 1. Lectins and antibodies employed. Species of elaboration, manufacturer, dilutions, catalog number.

Ab/Lectin	1st Ab Species/Dilution	1st Ab Catalogue Number	2nd Ab Species/Dilution (Catalogue Number)
Anti-Gαo	Rabbit 1:100	MBL 551	ImmPRESS VR HRP Anti-Rabbit IgG MP-6401-15
Anti-Gαi2	Rabbit 1:100	Sta Cruz SC-7276	ImmPRESS VR HRP Anti-Rabbit IgG MP-6401-15
Anti-OMP	Goat 1:400	Wako S44-10001	Horse 1:250 Vector BA-9500
Anti-MAP2	Mouse 1:200	Sigma M4403	ImmPRESS VR HRP Anti-Mouse IgG MP-6402-15
Anti-GAP43	Mouse 1:800	Sigma G9264	ImmPRESS VR HRP Anti-Mouse IgG MP-6402-15
Anti-GFAP	Rabbit 1:400	Dako Z0334	ImmPRESS VR HRP Anti-Rabbit IgG MP-6401-15
Anti-Calbindin	Rabbit 1:5000	Swant CB38	ImmPRESS VR HRP Anti-Rabbit IgG MP-6401-15
Anti-Calretinin	Rabbit 1:5000	Swant 7697	ImmPRESS VR HRP Anti-Rabbit IgG MP-6401-15

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Table 1. *Cont.*

Ab/Lectin	1st Ab Species/Dilution	1st Ab Catalogue Number	2nd Ab Species/Dilution (Catalogue Number)
Anti-SMI32	Rabbit 1:20	ENZ-ABS219-0100	ImmPRESS VR HRP Anti-Rabbit IgG MP-6401-15
UEA-I	1:10	Vector L-1060	Rabbit 1:50 DAKO P289
LEA	20 µg/mL	Vector B-1175	Vectastain ABC reagent PK-4000
BSI-B_4	100 µm/mL	Sigma L-2140	Vectastain ABC reagent PK-4000

In all the immunohistochemical procedures, samples for which the primary antibody was omitted were used as negative controls, without obtaining labelling or unspecific background in any case. As positive controls, we replicated the immunohistochemical procedure with mouse tissues known to express the proteins of interest, obtaining the expected positive results.

2.4. Histochemical Labelling (HQ) with Lectins

Lectin-histochemical labelling is based on the use of the bond established between agglutinins, called lectins, with carbohydrates that form glycoconjugates in tissue components.

For this study we used three lectins: UEA (*Ulex europeaus* agglutinin), LEA (*Lycopersicon esculentum* agglutinin), and BSI-B_4 (*Bandeiraea simplicifolia* isolectin B_4). UEA comes from gorse and is able to bind the L-fucose presents in both glycolipids and glycoproteins [58]. This lectin specifically labels the canid vomeronasal system [59]. LEA from tomato has affinity towards N-acetylglucosamine [60] and is a specific marker for both olfactory systems [61]. BSI-B_4 is a lectin with an affinity for terminal a-galactose extracted from the seeds of the legume shrub *Griffonia simplicifolia* [62] that is specific for the VNS in both rats [63] and opossums [64].

2.4.1. LEA and BSI-B_4 HQ Protocol

Biotinylated conjugates of LEA and BSI-B_4 were used for this study (see details in Table 1). (i) We used 3% hydrogen peroxide (H_2O_2) solution to suppress the endogenous peroxidase activity. (ii) After two washes in 0.1 M phosphate-buffered (pH 7.2) solution (PB), (iii) the sections were incubated for 30 min in a 2% bovine serum albumin (BSA) in PB. (iv) Slides were then incubated overnight at 4 °C with LEA and BSI-B_4 lectins, independently, in a 0.5% BSA solution. (v) After 2 washes in PB, (vi) they were incubated during 1.5 h at room temperature with avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) reagent (Vectastain; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). (vi) The slides were developed in the same way as the slides in the IHQ protocol.

2.4.2. UEA-I HQ Protocol

As with the LEA and BSI-B_4 lectins, after deparaffinizing and rehydrating the slides (i) they were incubated in 3% H_2O_2 solution. (ii) Then, they were incubated for 1 h at room temperature in a 0.5% BSA/UEA-I solution and (iii) then they were washed for 3 × 5 min in a PB solution. (iv) The slides were then incubated overnight at 4 °C with an anti-UEA-I peroxidase-conjugated antibody. (v) The next day, the samples were washed with a PB solution, and (vi) a DAB solution was added to visualize the reaction, as described for the LEA and BSI-B_4 lectins.

Controls were performed for both protocols, both without the addition of lectins and with the preabsorption of lectins, by using an excess amount of the corresponding sugar.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.5. Acquisition of Images and Digital Treatment

Pictures were taken with a Karl Zeiss Axiocam MRc5 digital camera coupled to a Zeiss Axiophot microscope. If necessary, Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA) was used to adjust parameters such as brightness or contrast, balance light levels,

and crop or resize images for presentation in this work. No specific characteristics within the images were altered, enhanced, moved or introduced. Some photomicrographs were formed as a mosaic of several pictures merged with two different image-stitching softwares (PTGui Pro and AutoStich).

3. Results

3.1. Macroscopic Study

Prior to the dissection of the meerkat OB, both the oral and nasal cavities were examined to identify the main topographical landmarks of the VNS, as the VNS had not been previously described in this species. The incisive papilla (IP) represents an important access point through which pheromones reach the VNO, consisting of an elevation of the mucosa at the roof of the palate into which the nasopalatine duct opens. Also known as the incisive duct, the IP establishes direct communication with the vomeronasal duct. After separating the jaws (Figure 1A), the masticatory muscles were sectioned, and the mandible was dislocated at the level of the temporomandibular joint to facilitate access to the palatal mucosa (Figure 1B). The IP is located in the anterior region of the soft palate, caudal to the upper incisor teeth. The skin and muscle layers covering the skull and face were then removed. The cross-sectioning of the nasal cavity at the level of the first premolar allowed us to appreciate the development of the nasal septum, the dorsal and ventral nasal turbinates, and the presence of the VNO, which is located in the ventral region of the nasal septum on both sides of the vomer bone (Figure 1C).

After removing the anterior part of the skull in one animal and dissecting out the frontal lobe, the dorsal area of the OB could be observed in situ, with no evidence, beyond a minimal dorsomedial elevation, of the presumed AOB (Figure 1D). After extracting the entire intact encephalon from two other specimens, the OB was found to be well-developed and kidney-shaped (Figure 1E–H). The remaining olfactory structures that comprise the rhinencephalon were visible in a ventral view: the olfactory peduncle, olfactory tubercle, and piriform lobe (Figure 1F). After separating both hemiencephalons at the longitudinal fissure (Figure 1G), the medial aspect of the OB was visible in greater detail (Figure 1H); however, the AOB could not be identified. A very small protuberance on the posterior third of the medial edge of the MOB was noted, which was presumed to be the location of the AOB (arrowhead in Figure 1H), an assumption that was later confirmed by histological serial sectioning of the whole OB.

3.2. Microscopical Study

3.2.1. Histological Study

The serial microscopic study of the OB with hematoxylin-eosin (HE) and Nissl stains confirmed that the majority of the OB located at the rostral aspect of the brain is occupied by the MOB (Figures 2 and 3A). The existence of an AOB in the meerkat was also indicated by the microscopic study, although the small size of the AOB prevented its localization by macroscopic dissection. The microscopic study also allowed for the determination of the degree of lamination compared with the MOB, which is structurally organized following a pattern that is common among mammalian species.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

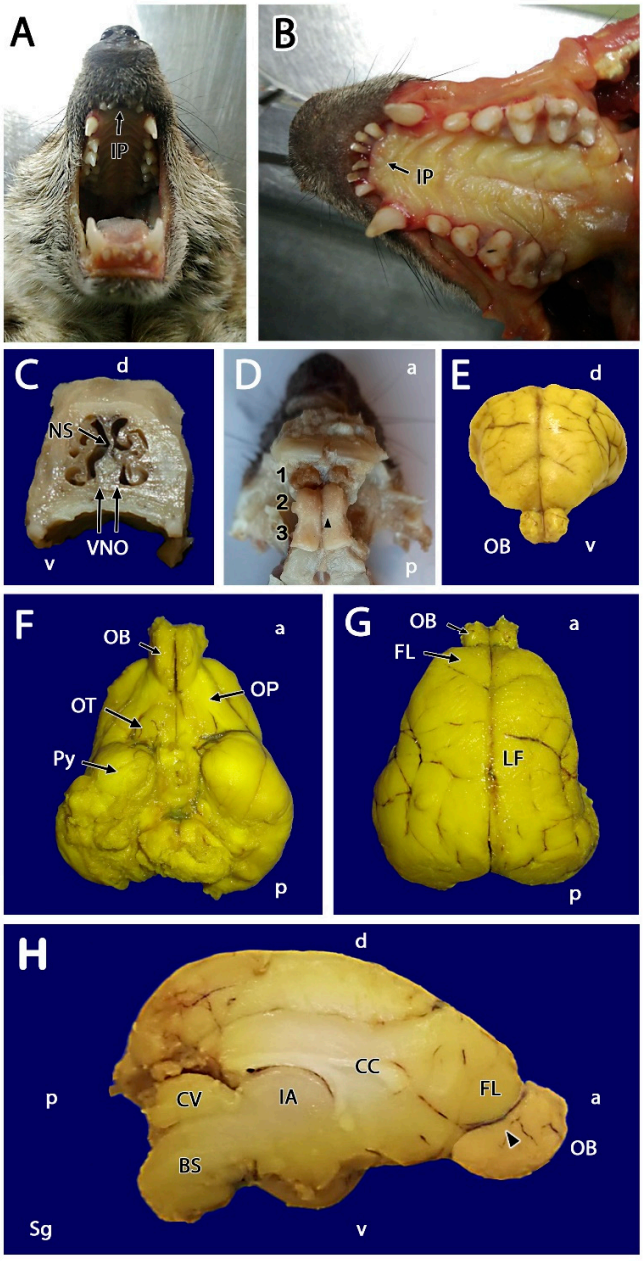

Figure 1. Main macroscopic features of the vomeronasal system of the meerkat. (**A**) Cranioventral view of the palate allows the identification of the incisive papilla (IP) area. (**B**) The IP is visible after the removal of the mandible. (**C**) Transverse section of the nasal cavity at the level of the first premolar, showing the vomeronasal organ (VNO) at the base of the nasal septum (NS), on both sides of the vomer bone (right). (**D**) Dorsal view of a dissection of the OB. The skull has been removed and the frontal lobe has been extracted. The presumptive area of localization for the right accessory olfactory bulb is indicated (arrowhead). 1, Ethmoidal conchae; 2, Olfactory bulb; 3, Olfactory peduncle. (**E**) In the rostral view of the brain is visible the development of the olfactory bulbs (OB) and their topographical relationship with the frontal lobe of the telencephalon. (**F**) Ventral view of the brain showing the olfactory system of the meerkat: olfactory bulb (OB), olfactory peduncle (OP), olfactory tubercle (OT), and pyriform lobe (Py). (**G**) Dorsal view of the brain showing the longitudinal fissure of the telencephalon (LF) as well as the arrangement and relative size of the olfactory bulbs. (**H**) Medial view of the left hemiencephalon showing the following anatomical structures: corpus callosum (CC), interthalamic adhesion (IA), brainstem (BS), cerebellar vermis (CV), frontal lobe (FL), and olfactory bulb (OB). The black arrowhead points to the presumptive area of localization of the accessory olfactory bulb. a, anterior; d, dorsal; p, posterior; v, ventral.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

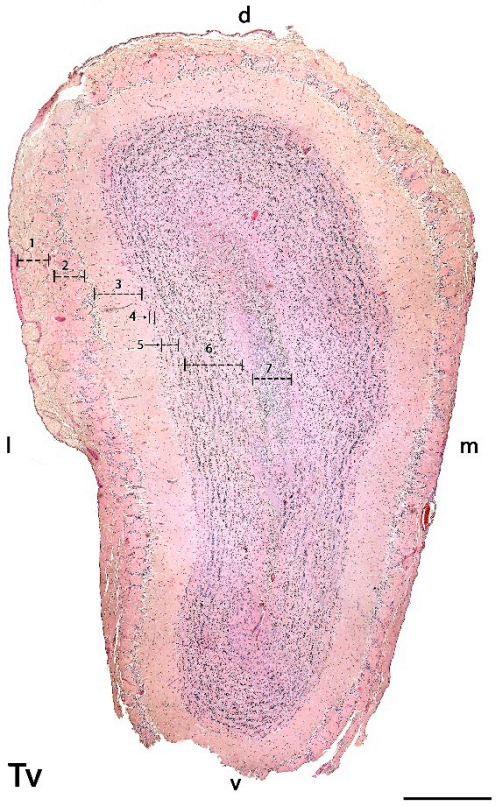

Figure 2. Transverse section of the main olfactory bulb of the meerkat stained by hematoxylin-eosin. From superficial to deep the following layers are identified: 1. Olfactory nerve layer (ONL), 2. Glomerular layer (GlL), 3. External plexiform layer (EPL), 4. Mitral layer (ML), 5. Internal plexiform layer (IPL), 6. Granular layer (GrL), 7. Subventricular zone (SVZ). d, dorsal; l, lateral; m, medial; v, ventral. Scale bars: 600 μm. Tv, Transverse.

We were able to easily identify the typical seven-layer structure of the MOB in both transverse (Figure 2) and sagittal (Figure 3A) sections. Moving from the superficial to deep planes, these layers include:

1. Olfactory nerve layer (ONL): Formed by the axons of the olfactory nerves that reach the MOB.
2. Glomerular layer (GlL): Composed of the glomeruli, which are spherical structures delimited by periglomerular (PG) cells that originate from the confluence of olfactory nerve axons synapsing with the dendrites of mitral cells, which represent the second neurons in olfactory pathways.
3. External plexiform layer (EPL): A nerve plexus with a low cell density, primarily occupied by the dendrites of mitral cells.
4. Mitral cell layer (MCL): Formed by the somas of mitral cells.
5. Internal plexiform layer (IPL): A thin band of white matter interposed between the mitral and granular layers that is very reduced in the meerkat.
6. Granular layer (GrL): Contains large clusters of granule cells, which serve as inhibitory neurons in the neural circuit of the MOB.
7. Subventricular zone (SVZ): Nervous tissue arranged around the rostral horn of the encephalic lateral ventricles, primarily composed of neuronal precursor cells involved in adult neurogenesis. The SVZ in meerkats is highly and strikingly developed, presenting a large cellular infiltrate.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

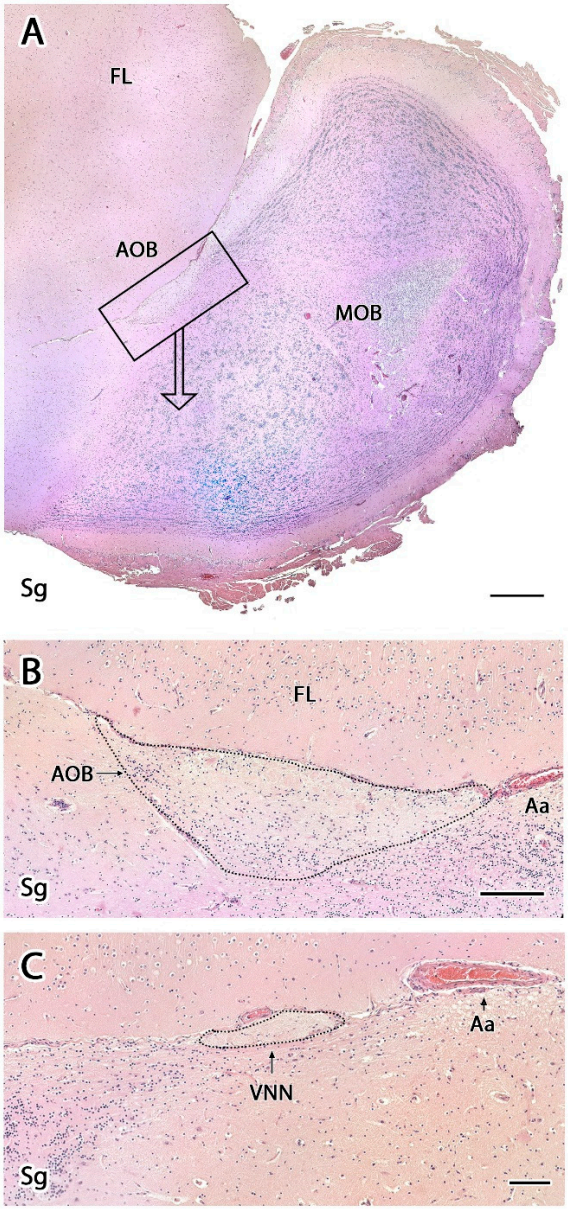

Figure 3. Sagittal sections of the olfactory bulbs of the meerkat stained with Hematoxylin-eosin. (**A**) Sagittal section of the rostral portion of the brain of the meerkat. The frontal lobe (FL), the main olfactory bulb (MOB), and the location, in the caudal part of the MOB, of the accessory olfactory bulb (AOB) are shown. (**B**) Higher magnification of the box in (**A**) showing the AOB. Following the course of the vomeronasal nerve throughout the sagittal histological series, we arrived at the area bordered by the dotted line that corresponds to the AOB. Its size is relatively small and its lamination, diffuse. It is better discriminated with the Nissl stain (Figures 4 and 5). (**C**) A more medial sagittal section than B shows the arrival of the vomeronasal nerve through the medial surface of the main olfactory bulb in direct topographical relationship to a large-caliber artery (Aa). Scale bars: (**A**): 600 µm. (**B**): 200 µm. (**C**): 100 µm. VNN, vomeronasal nerve, Sg, Sagittal.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

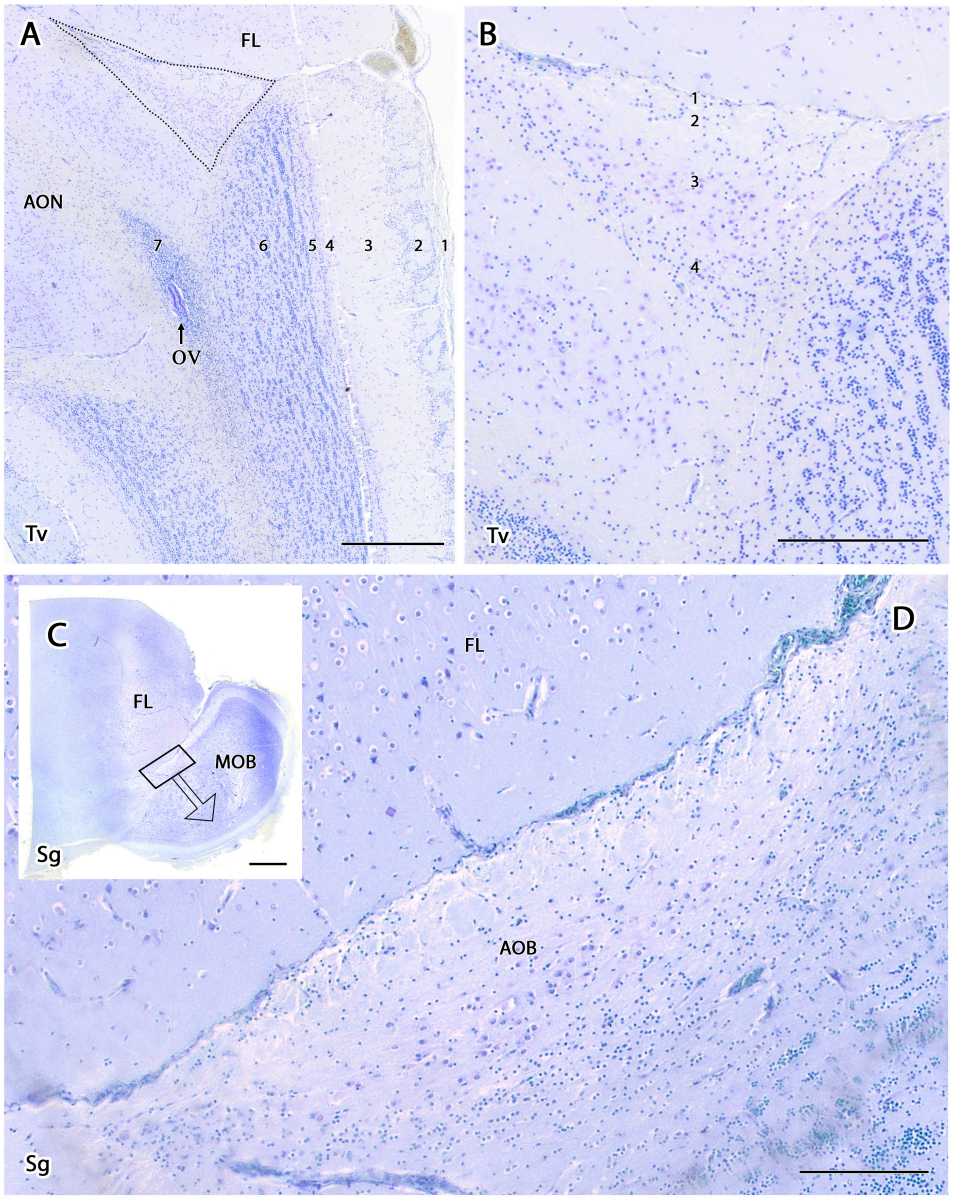

Figure 4. Histological study of the accessory olfactory bulb of the meerkat with Nissl staining. (**A**) Transverse section of the olfactory bulb showing the projection area of the accessory olfactory bulb (AOB) (delimited by dots), the lamination of the main olfactory bulb and the anterior olfactory nucleus (AON). The numbering of the layers is identical to that employed in Figure 2. (**B**) Enlargement of the AOB shown in A with its different layers numbered. 1, Vomeronasal nerve layer; 2, Glomerular layer; 3, Mitral-plexiform layer; 4, Granular layer. (**C**) Sagittal section of the olfactory bulb and the frontal lobe (FL) of the telencephalon showing the lamination of the main olfactory bulb (MOB) and the presence of the AOB in its caudomedial part. (**D**) Enlargement of the box in (**C**) showing the histology of the AOB. OV, olfactory ventricle. Scale bars: (**A**) 400 µm; (**B**) 200 µm; (**C**) 1200 µm; (**D**) 150 µm.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

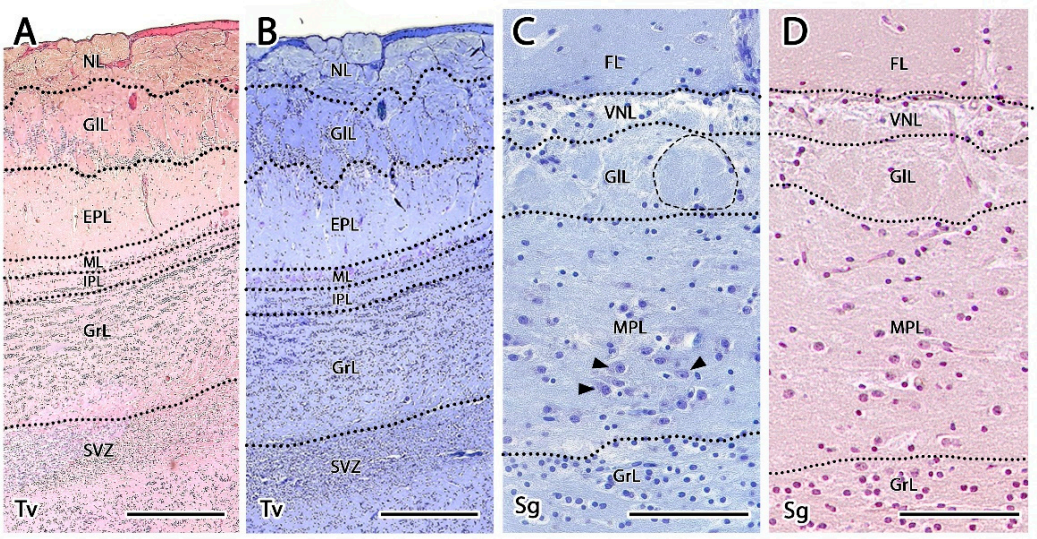

Figure 5. Histological comparative study of the lamination of both the main and accessory olfactory bulbs. Lamination of the main olfactory bulb showed with HE (**A**) and Nissl staining (**B**): olfactory nerve layer (NL), glomerular layer (GlL), external plexiform layer (EPL), mitral layer (ML), internal plexiform layer (IPL), granular layer (GrL), subventricular zone (SVZ). The lamination of the accessory olfactory bulb is shown with HE (**C**) and Nissl staining (**D**): vomeronasal nerve layer (VNL), glomerular layer (GlL), mitral-plexiform layer (MPL) and granular layer (GrL). The small degree of differentiation of the accessory olfactory bulb glomeruli is mainly due to the scarcity of periglomerular cells. Only in a few cases (dotted line) is the usual spherical shape visible. The main cells of the AOB are diffusely distributed along the mitral-plexiform layer, especially in its deepest zone. They are oval or polyhedral in shape (black arrowhead). Granular cells are smaller and distributed in irregular clusters. Front lobe of the telencephalon (FL). Tv: transversal plane, Sg: sagittal plane. Scale bars: (**A**–**D**): 100 µm.

The sagittal microscopic series (Figure 3A) allowed us to confirm the lamination of the MOB observed in the transverse section and facilitated the location at which the vomeronasal nerves (VNNs) enter the brain (Figure 3C), together with an artery of remarkable size. This region corresponds to the AOB, which is located in the caudomedial zone of the MOB, in a direct topographic relationship with the frontal lobe of the telencephalon. The meerkat AOB is characterized by small size and a low degree of differentiation among its layers (Figure 3B). Nissl staining (Figures 4 and 5) is particularly useful for characterizing the cellular elements and layers that comprise the AOB. In both transverse (Figure 4A,B) and sagittal sections (Figure 4C,D), the low degree of cellularity in the AOB compared with the MOB is striking, making the differentiation of the AOB from the MOB challenging, particularly in the sagittal plane. To understand the peculiar organization of the AOB in the meerkat, a comparative study of the lamination was performed between the MOB and AOB, as shown in Figure 5. The complex histological structure of the MOB is reduced to the following four layers in the AOB:

1. Vomeronasal nerve layer (VNL): formed by the arrival of VNN axons.
2. Glomerular layer (GlL): glomeruli in the AOB show poorer definition and fewer PG cells than their MOB equivalents (Figure 5C,D).
3. Mitral-plexiform layer (MPL): the cells of the mitral layer are not organized in a monolayer, as observed in the MOB (Figure 4A,B), but are diffusely distributed, occupying a large neuropil due to the fusion of the external and internal plexiform layers with the mitral layer, forming what we term the MPL. The main cells found in this layer present an ovoidal morphology, reminiscent of the morphology of mitral cells in the MOB (Figure 5C,D).
4. Granular layer (GrL): presenting with a higher cell density, the neurons in this layer have small nuclei and compact cytoplasms (Figure 5C,D).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Compared with the AOB, the cytological study of the MOB shows more diverse cellularity. The GlL is formed by typical, large, spherical glomeruli surrounded by numerous PG cells (Figure 6A), forming a broad band in the boundaries with the deeper layer. This band contains scattered neurons with large somas. The GrL is organized into large clusters of granule cells, interspersed with large neuronal somas (Figure 6B). Mitral cell somas are ordered along the MCL, forming a monolayer, whereas the EPL contains tufted cells (Figure 6C). The deeper area of the MOB contains the rostral horn of the lateral ventricle, known as the olfactory ventricle, with associated ependyma and the dense proliferative zone characteristic of the SVZ (Figure 6D).

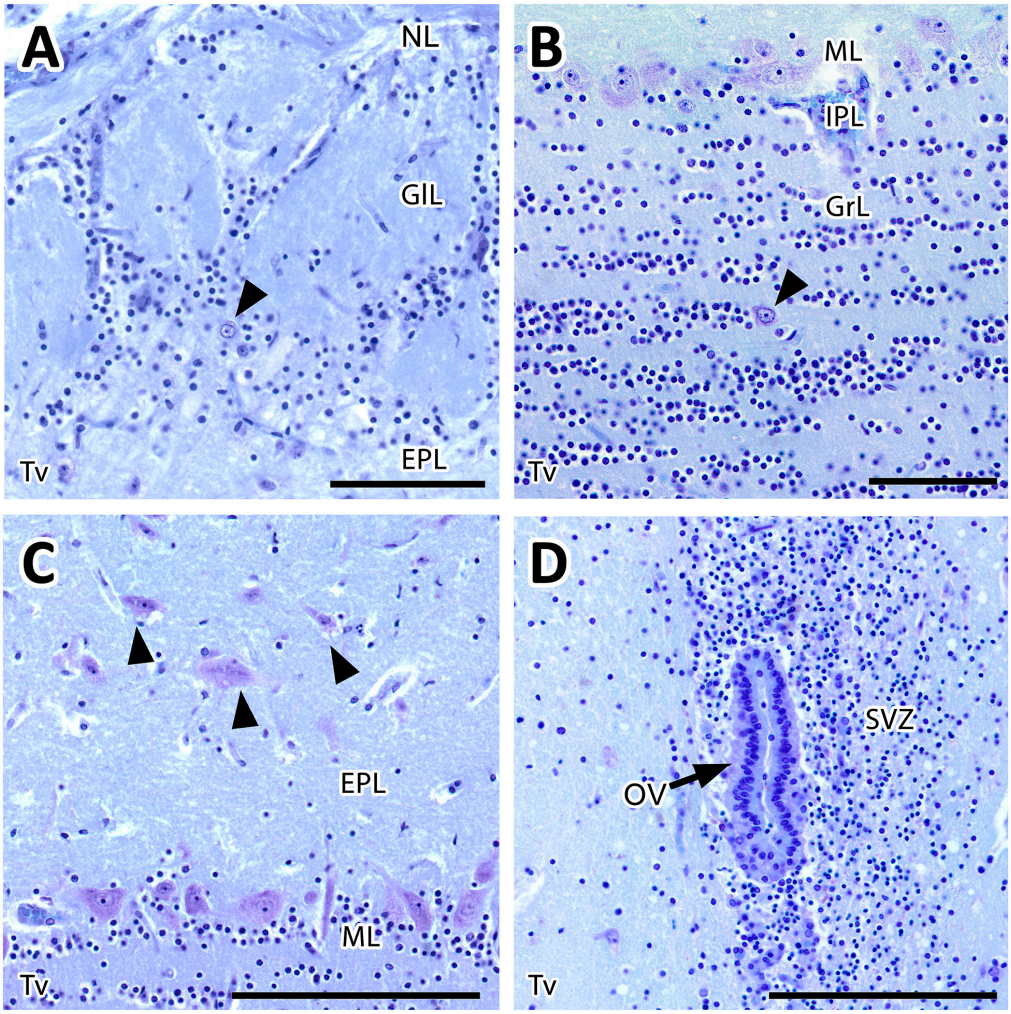

Figure 6. Histological study with Nissl stain of the structure of the main olfactory bulb. (**A**) The glomerular layer (GlL) comprises the typical spherical glomeruli surrounded by numerous periglomerular cells. Scattered neurons with large somas are also found (arrowhead). (**B**) The granular layer (GrL) is formed by neat clusters of granule cells interspersed with large neuronal somas (arrowhead). (**C**) Mitral cells somas are aligned along the mitral layer (ML), whereas the external plexiform layer (EPL) contains tufted cells (arrowheads). (**D**) The deep area of the MOB contains the rostral horn of the lateral ventricle, the olfactory ventricle (OV), with its ependyma (arrow) and a dense proliferative zone characteristic of the subventricular zone (SVZ) neuroprogenitor cells. NL, nerve layer. Scale bars: (**A**,**B**) 50 µm; (**C**,**D**) 100 µm.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.2.2. Immunohistochemical Study

The Gαo and Gαi2 subunits of G proteins are useful markers for characterizing the expression of the two main VR families, V1R and V2R, in the AOB. Anti-Gαi2 antibodies revealed strong positive labelling in the AOB and the VNNs (Figure 7A). The VNL and GlL

showed immunopositivity within the AOB, whereas the MPL and GrL were immunonegative (Figure 7C). The immunopositivity of the two superficial layers is due to the expression of VR proteins in VNN axons, which are distributed along the AOB surface and form the VNL, and at their axon terminals, which are found in the GlL, where they synapse with the dendrites of the second neurons of the vomeronasal pathway. This labelling allowed us to immunohistochemically confirm the presence of the AOB in the meerkat in both sagittal and transverse sections, which corresponded to the structures identified by HE and Nissl staining (Figures 3 and 4). The anti-Gαi2 antibody specifically labelled the AOB, without labelling any features of the MOB.

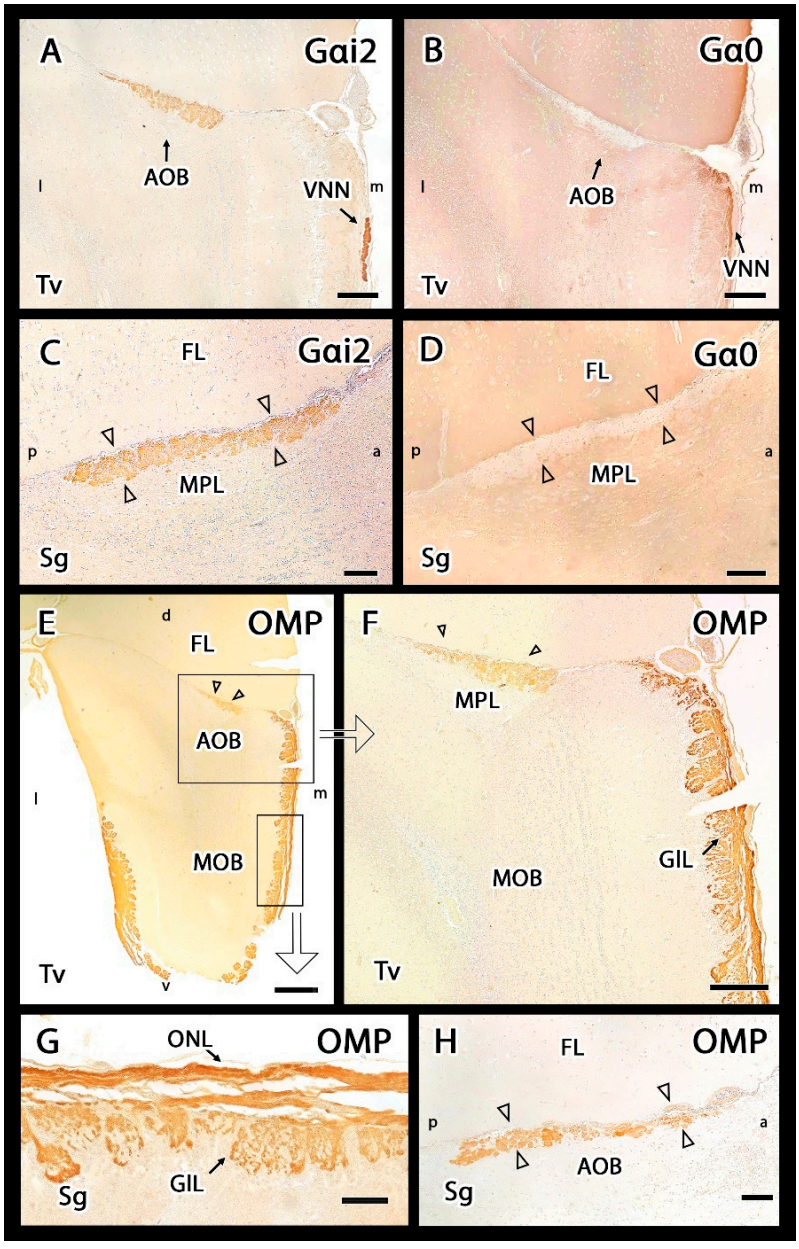

Figure 7. Immunohistochemical study of Gαo, Gαi2 and OMP proteins in the main and accessory olfactory bulbs of the meerkat. (**A**,**C**) Anti-Gαi2 immunolabels specifically the accessory olfactory bulb (AOB). Transverse section (**A**) and hematoxylin counterstained sagittal section (**C**) show strong immunopositivity confined to the vomeronasal nerve and glomerular layers of the AOB (arrowheads in (**C**)) as well as in the vomeronasal nerve (VNN in (**A**)). (**B**,**D**) Anti-Gαo immunolabelling in transverse and sagittal sections of the OB consecutive to the previous one showing a positive response complementary to that described for anti-Gαi2. That is, labelling in the whole main olfactory bulb

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(MOB) and both the mitral-plexiform (MPL) and granular layers of the AOB and absence of labelling in the superficial layers of the AOB (arrowheads in (**D**)). The VNN is not immunolabelled. (**E**–**H**) Anti-OMP immunolabelling. (**E**) Transverse section of the whole OB shows immunoreactivity in the superficial layers of both the MOB and AOB. (**F**) Enlargement of the upper box in (**E**). The immunostaining is confined to the nerve and glomerular layers. (**G**) Enlargement of the lower box in (**E**). Within the glomeruli, only the nervous component is labelled. (**H**) Sagittal section of the AOB showing at more magnification how the immunolabelling comprises the nerve and glomerular layers (arrowheads). a, anterior; d, dorsal; l, lateral; v, ventral; m, medial; p, posterior; Sg, sagittal; Tv, transverse. Scale bars: (**A**,**C**,**F**,**H**) 200 µm; (**B**,**D**,**G**) 100 µm; (**E**) 400 µm.

Immunolabelling with the anti-Gαo antibody showed a complementary pattern to anti-Gαi2 labelling. In the AOB, anti-Gαo was immunonegative in the VNL and GlL. However, the deeper layers, including the MPL and GrL were immunopositive (Figure 7B,D). This immunopositivity extended to the remaining nerve structures: the entire MOB and the frontal lobe of the telencephalon.

The anti-OMP antibody selectively labels the OMP protein, which is specifically expressed by mature olfactory and vomeronasal sensory neurons. OMP staining produced a generalized reaction in the superficial nerve layer and GlL of both the MOB and AOB in both VNNs and olfactory nerves (Figure 7E–H). The intensity of OMP immunostaining was stronger in the MOB than in the AOB.

The GAP-43 antibody is typically used as a marker for axonal growth cones. In this study, GAP-43 positivity could be observed in the VNL, GlL, and GrL of the AOB, whereas the MPL was immunonegative (Figure 8A,B). In the MOB, GAP-43 immunopositivity was observed in the ONL, IPL, and GrL (Figure 8D). SMI-32 was present in the soma and dendrites of the principal MOB neurons, mitral, and tufted cells (Figure 8C,E). In the AOB, this antibody produced negative labelling. Anti-MAP-2 is an additional marker for the neural somas and dendrites. In both the MOB and AOB, MAP-2 labelling could be observed in the dendritic tree of principal cells, resulting in diffuse labelling of the mitral, plexiform, and granular layers (Figure 8F).

Anti-GFAP produced immunolabelling in both the AOB and MOB. In the AOB, GFAP was primarily identified in the VNL (Figure 9A). The glial elements recognized by this marker primarily corresponded to the fibers of the ensheathing glia, although in the deeper layers of the AOB, some astrocytes could also be observed (Figure 9B). In the MOB, GFAP immunolabelling was concentrated in the astrocytes located in the superficial layers, and the deeper neuropil of the MOB and the frontal lobe were also immunopositive.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

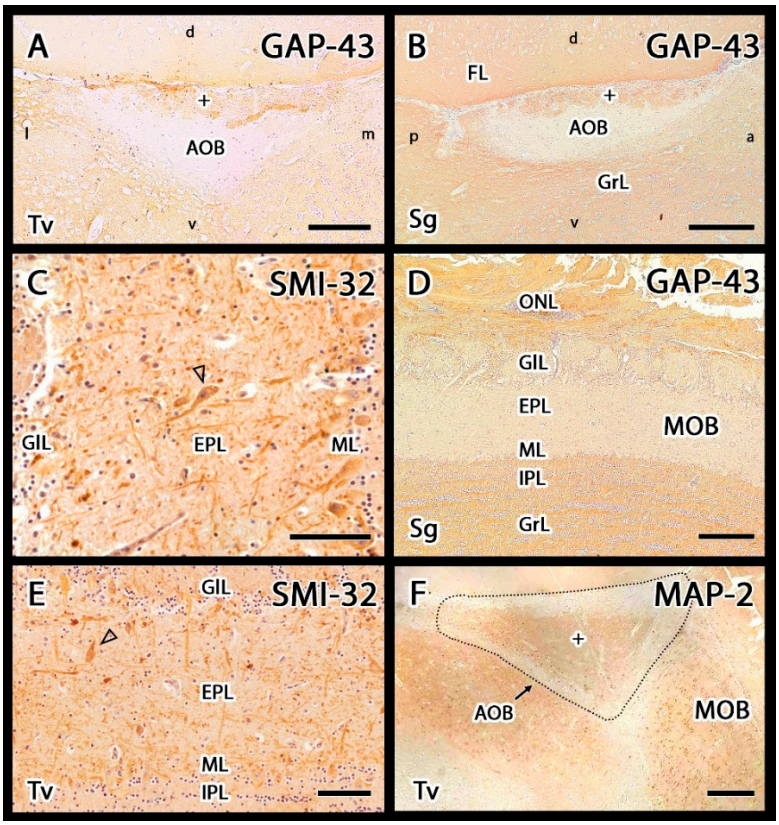

Figure 8. Immunohistochemical study of the olfactory bulb in meerkat (GAP-43, SMI-32 and MAP-2 markers). (**A**,**B**) Anti-GAP-43 produces in both transverse (**A**) and sagittal (**B**) sections a strong immunopositive labelling in the nerve, glomerular (+) and granular layers (Grl) of the AOB. (**D**) In the MOB Anti-GAP-43 marker showed immunopositivity in the ONL, IPL and GrL. (**C**,**E**) Anti-SMI-32 immunolabelling; hematoxylin counterstaining. This marker is immunonegative in the AOB, but it produces strong positivity in the principal cells of the MOB (arrowheads). (**F**) Anti-MAP-2 labels the mitral-plexiform and granular layers of the AOB (+) and the plexiform and mitral layers of the MOB. Sg: Sagittal; Tv, Transverse. Scale bars: (**A**,**C**,**E**,**F**) 100 µm; (**B**,**D**) 200 µm.

In both the transverse (Figure 10A,B) and sagittal (Figure 10C) sections of the OB, anti-CB antibody produced a very characteristic pattern, in which the VNNs of the VNL and GlL of the AOB were strongly stained, whereas the remaining AOB layers showed very weak staining. Although the glomeruli of the AOB were strongly stained, no positive staining was observed in the PG cells. By contrast, the study of anti-CB immunostaining in the MOB (Figure 10B) produced intense staining of the PG cells, whereas the glomerular neuropil showed very faint staining. Counterstained sections allowed for the determination that only a subpopulation of PG cells was CB-immunopositive (Figure 10D).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

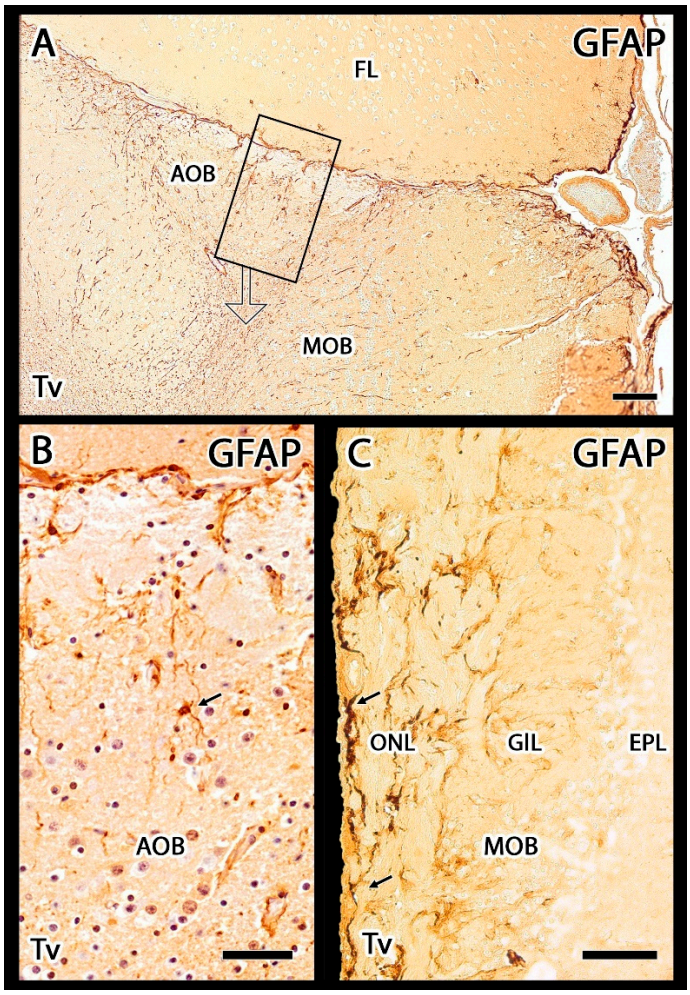

Figure 9. Immunohistochemical labelling of the meerkat OB with anti-GFAP. (**A**) Anti-GFAP produces a strong labelling in the nerve layer of both the accessory and (**C**) main olfactory bulbs. The labelling in these layers corresponds to glial cell fibers, mainly ensheathing cells. (**B**) Enlargement of the box in (**A**) after hematoxylin counterstaining, showing fibers and astrocytes in the mitral-plexiform layer of the AOB (arrow). (**C**) In the MOB there is a remarkable presence of astrocytes in the superficial layers (arrows). Scale bars: (**A**,**C**) 100 µm; (**B**) 50 µm.

Anti-CR produced strong immunopositivity in the AOB, the VNNs, and the glomeruli of the MOB (Figure 11). Immunolabelling in the AOB was concentrated in the VNL and GlL, with some staining also observed in the mitral-plexiform and granular layers but to a lesser extent (Figure 11A,B). Whereas no immunolabelled cellular elements were observed in the superficial layers of the AOB, stained neurons could be observed in the MPL and GrL (Figure 11B,D,E), mainly immunopositive mitral cells. However, positive granule cells were scarce, and they tended to be isolated between immunonegative clusters (Figure 11E). Anti-CR immunolabelling of the MOB (Figure 11C,F,G) revealed a subpopulation of immunopositive PG cells (Figure 11C,F). Strikingly, the neuropil of most glomeruli in the MOB was negative, except for a subpopulation of atypical glomeruli in the vicinity of the AOB with strongly CR-positive neuropil (Figure 11C,F). In the deeper layers of the MOB, most of the mitral cell somas were immunopositive, as were isolated granule cells (Figure 11G). Additionally, CR-immunopositive cells were immunolabelled inside the vessels surrounding the VNN (Figure 11F).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

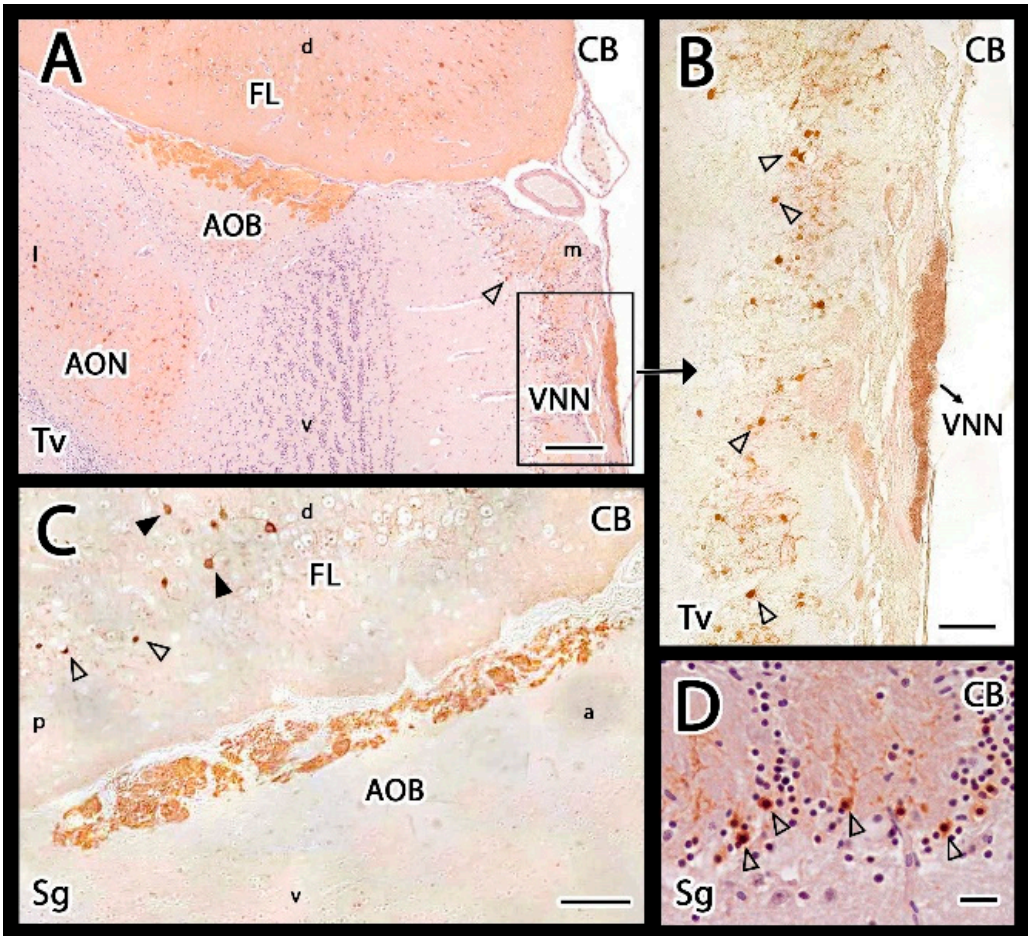

Figure 10. Immunolabelling with anti-calbindin (CB) in the olfactory bulb of the meerkat. (**A**) Transverse section of the olfactory bulb counterstained with hematoxylin showing strong immunopositivity to CB in the vomeronasal nerve (VNN), and in the neuropil of both the nerve and glomerular layers of the accessory olfactory bulb (AOB). Additionally, immunopositive neurons are observed in the cerebral cortex of the frontal lobe (FL), and the anterior olfactory nucleus (AON). (**B**) Enlargement of the inset in (**A**), not counterstained, showing the strong immunopositivity of the VNN (arrow) and the immunolabelling pattern of the main olfactory bulb (MOB). The arrowheads point to positive periglomerular cells belonging to the glomeruli of the MOB. (**C**) Sagittal section confirming the CB-immunopositivity of the AOB in its glomerular and nerve layers. Immunopositive cells with multipolar (black arrowheads) and granular (open arrowheads) morphology are observed in the FL. (**D**) Hematoxylin counterstaining in the glomerular layer of the MOB shows that only a subpopulation of periglomerular cells is CB-immunopositive (open arrowheads). Scale bars: (**A**,**C**) 100 µm; (**B**,**D**) 50 µm.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

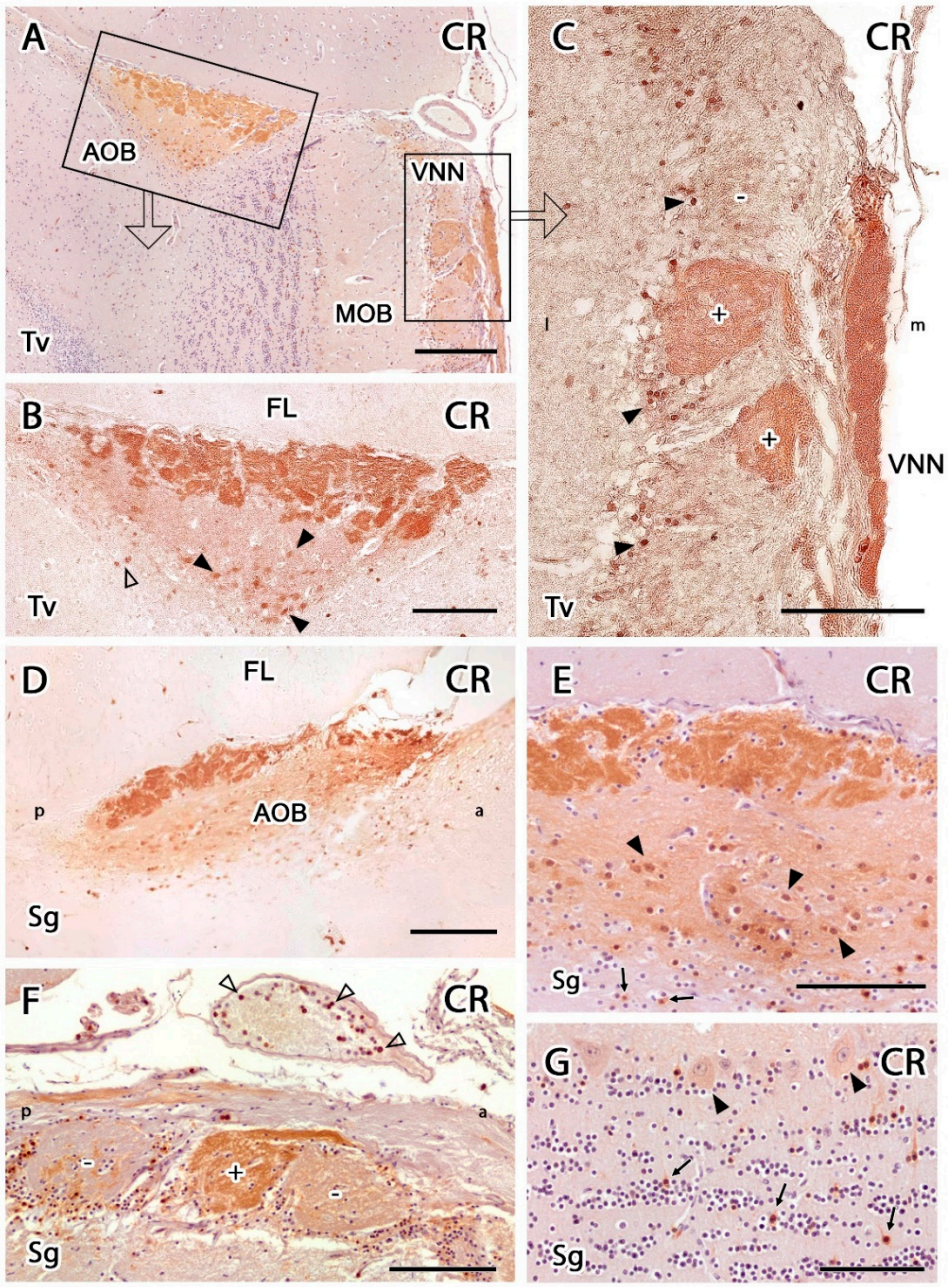

Figure 11. Anti-calretinin (CR) immunohistochemical study of the olfactory bulb in the meerkat. (**A**) Transverse section of the dorsomedial part of the olfactory bulb (OB) counterstained with hematoxylin. Strong immunopositivity can be seen in the accessory olfactory bulb (AOB), the vomeronasal nerve (VNN), and the glomeruli of the main olfactory bulb (MOB). (**B**) Enlargement of the left box in A, not counterstained. The immunolabelling of the AOB is concentrated in the nerve and glomerular layers and with less intensity in the mitral-plexiform and granular layers. Immunopositive mitral cells are identified in both the mitral-plexiform (black arrowhead) and granular layers (open arrowhead). (**C**) Enlargement of the area corresponding to the right box in A, but without counterstaining, showing the strong immunolabelling of the VNN and the presence in the dorsomedial part of the MOB of atypical CR-immunopositive glomeruli (+), in contrast to the typical CR-immunonegative glomeruli (−). A subpopulation of periglomerular cells were also immunopositive (arrowheads). (**D**) Sagittal section of the AOB confirming the positive immunolabelling pattern found in the transverse section. (**E**) Hematoxylin counterstained sagittal section of the AOB showing the density of immunopositive mitral cells in the mitral-plexiform layer (arrowheads) and isolated CR-positive granule cells in the

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

granular layer (arrow). (**F**) Hematoxylin counterstained sagittal section of the MOB showing an atypical immunopositive glomerulus (+), surrounded by two immunonegative glomeruli (−). Immunopositive cells also appear in the artery accompanying the vomeronasal nerve (arrowheads). (**G**) Hematoxylin counterstained sagittal section of the MOB showing immunopositive mitral cells in the MOB (arrowhead). Scattered CR-immunopositive granule cells are interspersed among immunonegative granular clusters (arrows). FL, frontal lobe; Sg, sagittal; Tv, transversal. Scale bars: (**A**) 200 µm; (**B**–**F**) 100 µm; (**G**) 50 µm.

3.2.3. Lectin Histochemical Study

The histochemical study with *Lycopersicum esculentum* lectin (LEA) produced very intense staining in the glomerular and nervous layers of the MOB (Figure 12A), whereas the deeper layers did not show any positive labelling (Figure 12B,C). The AOB showed a similar pattern but was less intense, with LEA labelling concentrated in the VNN and GlL (Figure 12C). UEA-I and BSI-B_4 staining did not result in any positive labelling in either the MOB or the AOB.

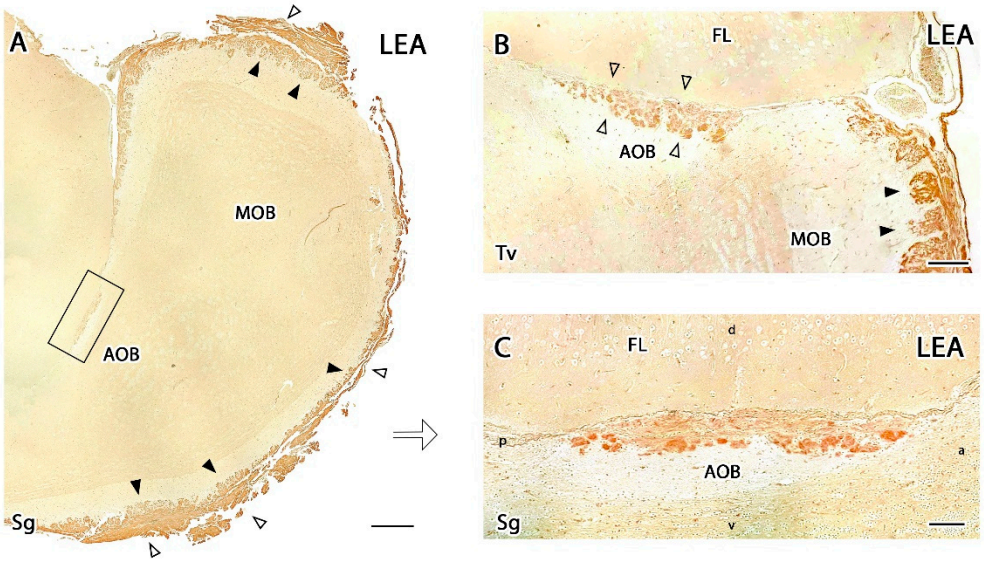

Figure 12. Histochemical study of the meerkat olfactory bulb with the lectin *Lycopersicum esculentum* (LEA). (**A**) Staining in the nerve (open arrowhead) and glomerular (black arrowhead) layers of the main olfactory bulb (MOB). Analogous layers of the accessory olfactory bulb (AOB) (box) show a less intense staining. (**B**) Transverse section of the olfactory bulb confirming the positive staining in the nerve and glomerular layers of both the AOB (open arrowheads), and MOB (black arrowheads). (**C**) Enlargement of the box in A showing LEA staining in the superficial layers of the AOB. Sg, sagittal plane; Tv, transverse plane. Scale bars: (**A**) 600 µm; (**B**) 100 µm; (**C**) 50 µm.

4. Discussion

The present study describes a comprehensive neuroanatomical and immunohistochemical characterization of the first integration center in the brain for information processed by the main and accessory olfactory systems of the meerkat. Despite the wide range of behaviors and physiological responses that have been described as mediated by chemical signals in this species, no neuroanatomical or immunohistochemical information was available for the meerkat OB. To our knowledge, no information for the OB is available for the entire Herpestidae family, except for a brief mention of dopaminergic PG neurons in the mongoose MOB within the context of a comprehensive study of the neurotransmitter systems found in the mongoose brain [65]. The adaptation of species to a very wide range of environments and the development of specific behavioral patterns has been associated with the distinct evolution of chemical communication systems and the diversification of the morphofunctional features of sensory organs and integrative nerve centers. These diverse

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

adaptations can make extrapolations of neuroanatomical features between species challenging and inadvisable, even among species belonging to the same family, necessitating the performance of species-specific studies.

4.1. Neuroanatomical Study

In general terms, our observations indicate that the meerkat MOB displays the general cytoarchitecture pattern observed in all carnivores. However, the AOB presents important differences, which is not surprising considering the great morphological diversity that has been described for this structure in other mammals [25,66]. These differences likely represent adaptations to the numerous social and reproductive behavioral peculiarities associated with this species, many of which are mediated by chemical signals [67].

The lamination and cytoarchitectural patterns observed in the meerkat MOB do not differ significantly from those found in other Carnivora [43,44], nor do they differ from the patterns described in species belonging to other mammalian orders, including Primates, such as the macaque [68]; Artiodactyla, such as the hippopotamus [69] or whale [70]; Proboscidea, such as the elephant [71]; or Rodentia, such as mice [72]. The MOB of the meerkat shows remarkable development of the GlL, containing an abundant number of PG cells, particularly in the deep zone; a broad MPL rich in abundant, and the neat organization of perfectly aligned mitral cells. The granular cells of the meerkat MOB are organized into clusters, and the development of the SVZ is particularly striking, characterized by a very dense accumulation of cells. The SVZ of the meerkat is superior to the SVZ of the dog fetus OB [73], which is thought to serve as a more representative model than rodents for the types of neurogenic events that occur in humans [74]. The SVZ of the adult brain has the largest capacity for the constitutive regeneration of new neural cells [75,76]. The MOB serves as the final destination of new neural cells generated in the central neurogenic niches of the SVZ, which migrate through the rostral migratory stream to the OB [77,78].

Although the internal organization of the mammalian AOB is predominantly laminar, important structural and phylogenetic variations have also been described [26]. Whereas the AOB is fully developed in some groups, such as Rodentia [79], Marsupialia [80–82], Primates [83], and Artiodactyla [84], in other species, such as the African elephant [71], the West Indian manatee [85], and humans [86], the AOB is absent or has not yet been identified. In species such as the mink [87], ferret [88], and some bats [89], the AOB is present but shows little development, reflected by small size and a general lack of any typical cytoarchitecture without neatly differentiated layers [26].

Meerkats belong to the order Carnivora, and the AOB of the meerkat can be compared with other Carnivora species, such as canids and felids, whose VNS have been studied in-depth. The cat (*Felis silvestris catus*) and the dog (*Canis lupus familiaris*) provide striking examples of the great disparity in the degree of differentiation that can exist in the AOB. The cat AOB is well-developed, macroscopically appreciable and shows a clear definition of layers [90]. However, the low degree of differentiation observed in the dog AOB is surprising [59,91,92] and has long been considered a controversial issue because it contrasts with the important roles played by pheromone-based chemosensory communications [93] and the highly social behaviors attributed to this species [94,95]. In 1902, Ramón y Cajal [96] ruled out the existence of an AOB in the dog. However, Jawlowski (1956) [97] and Miodonski (1968) [98] subsequently identified a putative AOB in canids, although these studies were not conclusive. In addition, the evidence presented from these studies consisted of drawings rather than actual images. However, their descriptions corresponded with the findings reported by Salazar et al. (1992) [99], who finally characterized the dog AOB using lectin histochemical studies.

In the meerkat, similar to canids, the AOB is difficult to identify macroscopically. However, microscopically, the pattern of lamination in the meerkat is more defined than that in dogs, resembling more closely the pattern described in cats, including well-defined glomeruli, a broad MPL with relatively numerous principal cells, and granular cells that are organized into clusters. This similarity was not unexpected because meerkats belong to

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

the suborder Feliformia. However, the thickness of the layers, the degree of glomerular differentiation, and the number of cells found in the meerkat AOB appear to be lower than those observed in the cat. These differences remain to be verified through the performance of a rigorous morphometric study with a minimum number of specimens.

These observations become even more relevant in the context of the debate regarding the taxonomic classification of the meerkat. Its assignment to a family of Feliformia has oscillated between Herpestidae and Viverridae [28]. The meerkat is currently considered part of Herpestidae, along with a large number of mongoose species that share a wide range of social complexities with meerkats. The wide range of morphological diversity in the VNS has served as a fruitful tool for establishing phylogenetic relationships between different mammalian species and identifying evolutionary pathways [100]. Despite the advent of genomic techniques, which have made possible the population-level characterization of genetic variability at a resolution that was unimaginable until recently, the study of morphological characteristics remains a crucial element in the taxonomic classification of mammals. The VNS remains an important reference for such studies [101,102]. Future studies on the neuroanatomical and neurochemical characteristics of the VNO and AOB of the meerkat, combined with future observations in other Viverridae and Herpestidae species, may help to clarify this taxonomic debate.

4.2. Immunohistochemical Study

Among the various immunohistochemical markers employed in this study, G protein labelling is of particular interest because it provides relevant information regarding the expression of VRs involved in the detection of sociosexual semiochemicals. G proteins are components of the cell-signaling cascades that are activated in VNNs [103]. The Gαi2 and Gαo subunits are associated with the two primary VR families, V1R and V2R, respectively [49,50]. The immunohistochemical analyses of G protein distribution in the AOB of several mammals initially demonstrated that V1R-Gαi2 neurons project to glomeruli located in the anterior region of the AOB, whereas V2R-Gαo neurons project to glomeruli in the posterior region of the AOB. This segregated projection has been described in Rodentia [104–106], Marsupialia [82,107], and Afrosoricidae [108]. However, this is not a uniform feature among mammals, as the Gαo pathway has deteriorated in several orders, including Carnivora, such as in dogs [59], cats [90], and foxes [109]; Artiodactyla [110]; Perissodactyla; Insectivora; Primates [111]; Hyracoidea [112]; and some Rodentia species, such as squirrels [112].

Our results regarding the expression of the G protein subunits Gαi2 and Gαo in the AOB align the meerkat with the group of mammals that have lost the expression of the V2R family. In the MOB, the expression patterns for both G proteins coincide with those observed in the mouse and in other studied mammals, presenting the ubiquitous expression of Gαo in virtually all glomeruli and the deep layers of the MOB and the absence of anti-Gαi2 immunolabelling [113,114].

OMP is a specific marker for neurons that originate in the olfactory and vomeronasal neuroepithelia and reach the superficial layers of the entire bulb [115]. In the adult meerkat, anti-OMP immunolabelling was restricted to the nerve strata and glomeruli of the OB, with slightly weaker expression in the AOB than in the MOB, similar to Lagomorpha [116], Didelphidae [117], and Vulpinidae [109]. Anti-GAP-43 is an additional and very useful marker for discriminating between mature axons and regenerating nerve fibers because GAP-43 expression in newly formed fibers decreases rapidly after the fibers reach their postsynaptic targets. Thus, GAP-43 is thought to be associated with the processes of neurite outgrowth and synaptic plasticity [54,118]. The olfactory system is a region of the adult nervous system that continues to exhibit extensive synaptic plasticity; therefore, the identification of high levels of GAP-43 expression in the meerkat OB is not surprising and resembles similar observations reported for other mammals, including the mouse [119] and rabbit [116].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Anti– MAP-2 and anti–SMI-32 were employed to characterize the principal cells of the OB. MAP-2 is a major component of microtubule junction bridges in dendrites and serves as a useful marker for the dendritic arbors of mitral/main cells [120]. In the meerkat, MAP-2 was primarily detected in the MPL and GrL of the AOB, presenting with the dense labelling of small neuronal somas, consistent with the pattern described in the OB of the rabbit [116]. Anti–SMI-32 primarily labels neuronal cell bodies and dendrites [52]. In the meerkat OB, anti–SMI-32 labelling was observed in the MOB, presenting intense stating of the somas and prolongations of the principal cells of the mitral and plexiform layers, similar to the pattern observed in other mammals, such as mice [121] and pangolins [47]. By contrast, monotremes show no SMI-32 labelling in the MOB [122]. In the meerkat, no appreciable anti–SMI-32 labelling was observed in the AOB, similar to the pattern described in pangolins [47].

The glial cell marker GFAP showed a high level of expression in the meerkat OB, suggesting active neuron-glial interactions, which are known to be involved in synaptic communication, plasticity, and the dynamic monitoring of brain function in the adult brain [123]. In the MOB, the anti-GFAP immunolabelling was concentrated in the superficial layers, whereas in the AOB, the glial processes extended throughout the structure, and immunostaining could be observed for astrocytes in the MPL. Anti-GFAP can also be used in mammals and other vertebrates to identify the ensheathing that myelinate the nerve fibers of the VNL [124,125]. The density of the glomerular cell bodies and fibers stained with anti-GFAP in the VNL, GlL, and MPL of the meerkat AOB contrasts with the limited numbers of astrocytes identified in the dog AOB [91] and more strongly resembles the dense labelling observed in the rat [57], wallaby [82], and fox [109] AOB.

Calcium-binding proteins are neuroactive substances expressed in large quantities in the OB, often used to identify segregated neuronal populations and allowing for the neurochemical distinction of neuronal types. In the VNL of the meerkat AOB, the vomeronasal fibers were completely immunopositive for both CB and CR, producing a strong neuropil staining in all glomeruli. However, PG cells were not immunopositive for either CR or CB, which may be associated with the low number of PG cells found in the Nissl staining.

AOB principal cells showed no immunostaining for either calcium-binding protein, similar to observations reported for the opossum [80], mouse [56], rat [126], and African wild dog, although in AOB of the latter species only CR expression was studied [46]. Overall, the anti-CR staining pattern observed in the AOB meerkat was similar to those observed in the rat [126], opossum [80], and African wild dog [46], whereas the pangolin displays a higher density of cellular elements and fibers, especially in the granular layer [47]. Anti-CB labelling observed in the surface layers of the AOB revealed more significant interspecies differences than anti-CR labelling. In rats [127] and opossums [80,128], the neuropil was stained much less strongly than that in the meerkat, and in both rats and opossums, some individual glomeruli of the AOB were stained strongly and were delimited by isolated positively stained PG cells.

The anti-CR pattern of immunolabelling in the MOB glomeruli (Figure 11) revealed the striking and intense immunolabelling of PG cells; however, in the neuropil, the anti-CR staining intensity was very weak, except for isolated subpopulations of unrelated glomeruli located in the vicinity of the AOB, which showed strong anti-CR immunostaining. Based on their location, these atypical glomeruli might be involved in the processing of chemical signals from the VNN, as has been hypothesized for the mouse olfactory limb glomeruli [129]. The presence of atypical glomeruli in the MOB is not a novel finding, as some examples have been described in the past, such as the necklace complex in mice [130] or the subset of glomeruli with high acetylcholinesterase reactivity [131]. To our knowledge, this is the first time that an atypical glomerular complex has been characterized by calcium-binding proteins, although studies of the OB using anti-CR antibodies in opossum [80] and African wild dogs [46] have identified subpopulations of CR-immunopositive glomeruli in the MOB; however, these studies did not provide information regarding the topographical relationship of these glomerular structures with the AOB. The presence of this atypical

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

organization in proximity to the AOB in the meerkat suggests that the integration of information from the VNO is more complex than previously thought and may involve structures beyond the AOB.

In addition to an atypical glomerular pattern, the meerkat MOB shows an overall lower density of reactive elements stained for both CB and CR than the domestic dog, a species that shows a very high density of these elements, especially in response to CR immunolabelling. However, the African wild dog shows a lower density of immunolabelling in the superficial layers of the MOB, which were the only layers described by Chengetanai et al. in their study of the African wild dog olfactory system [46]. The quantification study by Choi et al. [45] showed a remarkable decrease in the immunolabelling density in the dog with an increase in age, especially for anti-CB labelling, which could explain the differences in the labelling patterns reported for CB expression in domestic dogs, wild African dogs, and meerkats. The MOB of the pangolin shows a pattern of CB and CR expression similar to that of the meerkat, characterized by a high density of PG cells immunopositive for both markers and the slight positivity of mitral cells for CR. However, in the granular layer, the intensity of labelling is higher in the pangolin, particularly for CB [47].

4.3. Lectin Histochemical Study

We studied the carbohydrate expression pattern in the meerkat OB by employing histochemical labelling with three lectins. The functional significance of the sugar groups detected by lectins is large, as these carbohydrates are involved in neurite outgrowth, synaptic plasticity, signal transduction, and cell–cell interactions [132]. The expression of glycoconjugates in the OB is very heterogeneous and species-specific, with differences identified even between closely related species. Therefore, as previous studies have indicated, lectin histochemistry is a useful option for the specific characterization of the VNS, able to discriminate between anterior and posterior zones of the AOB [82], an assessment that should always be considered when characterizing the organization of the AOB.

UEA has been identified as a specific marker for the overall vomeronasal pathway (VNO, VNN, and AOB) in adult mice [79,133], whereas the lectin BSI-B_4 is recognized as an excellent VNS-specific marker in both rats [63] and opossums [64]. However, UEA did not produce positive labelling in the OB of the meerkat. A similar negative staining pattern has also been described in sheep [134], rabbits [116], and roe deer [84], whereas in other species, such as rats [63] and pigs [134], UEA labels both the MOS and the VNS. In meerkats, BSI-B_4 was immunonegative in both the AOB and MOB, similar to the pattern described in rabbits [116]. LEA, however, stained the nervous and glomerular layers of both the AOB and the MOB. This pattern is highly conserved, described in a wide range of species, including mouse [133], wallaby [82], fox [109], deer [84], sheep, and pig [134]. These results suggest that glycoconjugates are involved in the organization of the primary olfactory and vomeronasal pathways in meerkats; however, the basis for their detailed expression patterns remains poorly understood.

In summary, our exhaustive morphological characterization of both the MOB and the AOB of the meerkat indicates that this species displays a neuroanatomical organization consistent with the classification as a macrosmatic mammalian species. Specifically, our findings in the OB SVZ suggest that this species could be an interesting model for the study of adult neurogenesis in mammals. The AOB structural features show an intermediate pattern between the most-studied members of Carnivora dogs and cats. Neurochemically, the AOB follows the G protein expression pattern typical of Carnivora, characterized by the lone expression of V1R family VRs. The organization of the MOB and AOB revealed by using other immunohistochemical markers suggests subtle species-specific differences, such as the presence of CR-positive atypical glomeruli in the MOB, highlighting the importance of chemocommunication among this species.

Our observations should help to establish the morphological basis for precisely elucidating the roles played by olfaction and pheromonal communication in this iconic species.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Further anatomical studies should include other associated structures of both the MOS and VNS, in particular the olfactory nucleus and the amygdala.

5. Conclusions

This is the first study to reveal the neuroanatomical features of the MOS and VNS in the meerkat (*Suricata suricatta*), an iconic mammal with a marked social hierarchy. Our observations demonstrate that the degree of lamination and development of the meerkat MOB corresponds to a macrosmatic mammalian species. The chemosensory specialization for the detection of pheromones, including the expression of the V1R VR family and the deterioration of the V2R receptor family, was also observed.

Author Contributions: Conceptualization, M.V.T., I.O.-L. and P.S.-Q.; methodology, M.V.T., I.O.-L., A.F., J.L.R. and P.S.-Q.; investigation, M.V.T., I.O.-L. and P.S.-Q.; writing—original draft preparation, M.V.T., I.O.-L. and P.S.-Q.; writing—review and editing, M.V.T., I.O.-L. and P.S.-Q.; funding acquisition, P.S.-Q., M.V.T. and I.O.-L. contributed equally to this work. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable, as all the animals employed in this study were dead by natural causes.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript, and are fully available without restriction.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Meister, M. On the dimensionality of odor space. *Elife* **2015**, *4*, e07865. [CrossRef] [PubMed]
2. Kokocińska-Kusiak, A.; Woszczyło, M.; Zybala, M.; Maciocha, J.; Barłowska, K.; Dzięcioł, M. Canine Olfaction: Physiology, Behavior, and Possibilities for Practical Applications. *Animals* **2021**, *11*, 2463. [CrossRef] [PubMed]
3. Mollo, E.; Garson, M.J.; Polese, G.; Amodeo, P.; Ghiselin, M.T. Taste and smell in aquatic and terrestrial environments. *Nat. Prod. Rep.* **2017**, *34*, 496–513. [CrossRef] [PubMed]
4. Villamayor, P.R.; Arana, Á.J.; Coppel, C.; Ortiz-Leal, I.; Torres, M.V.; Sánchez-Quinteiro, P.; Sánchez, L. A comprehensive structural, lectin and immunohistochemical characterization of the zebrafish olfactory system. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 8865. [CrossRef] [PubMed]
5. Saraiva, L.R.; Ahuja, G.; Ivandic, I.; Syed, A.S.; Marioni, J.C.; Korsching, S.I.; Logan, D.W. Molecular and neuronal homology between the olfactory systems of zebrafish and mouse. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 11487. [CrossRef] [PubMed]
6. Breer, H.; Fleischer, J.; Strotmann, J. The sense of smell: Multiple olfactory subsystems. *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, *63*, 1465–1475. [CrossRef]
7. Salazar, I.; Sánchez-Quinteiro, P.; Barrios, A.W.; López Amado, M.; Vega, J.A. Anatomy of the olfactory mucosa. *Handb. Clin. Neurol.* **2019**, *164*, 47–65. [CrossRef] [PubMed]
8. Munger, S.D. Olfaction: Noses within noses. *Nature* **2009**, *459*, 521–522. [CrossRef]
9. Firestein, S. How the olfactory system makes sense of scents. *Nature* **2001**, *413*, 211–218. [CrossRef]
10. Zou, D.J.; Feinstein, P.; Rivers, A.L.; Mathews, G.A.; Kim, A.; Greer, C.A.; Mombaerts, P.; Firestein, S. Postnatal refinement of peripheral olfactory projections. *Science* **2004**, *304*, 1976–1979. [CrossRef]
11. Kondoh, D.; Tanaka, Y.; Kawai, Y.K.; Mineshige, T.; Watanabe, K.; Kobayashi, Y. Morphological and histological features of the vomeronasal organ in african pygmy hedgehog (*Atelerix albiventris*). *Animals* **2021**, *11*, 1462. [CrossRef] [PubMed]
12. Ennis, M.; Holy, T.E. Anatomy and neurobiology of the main and accessory olfactory bulbs. In *Handbook of Olfaction and Gustation*; Doty, R.L., Ed.; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2015; pp. 157–182. [CrossRef]
13. Fortes-Marco, L.; Lanuza, E.; Martinez-Garcia, F. Of pheromones and kairomones: What receptors mediate innate emotional responses? *Anat. Rec.* **2013**, *296*, 1346–1363. [CrossRef] [PubMed]
14. Ortiz-Leal, I.; Torres, M.V.; Villamayor, P.R.; López-Beceiro, A.; Sanchez-Quinteiro, P. The vomeronasal organ of wild canids: The fox (*Vulpes vulpes*) as a model. *J. Anat.* **2020**, *237*, 890–906. [CrossRef] [PubMed]
15. Booth, K.K.; Katz, L.S. Role of the vomeronasal organ in neonatal offspring recognition in sheep. *Biol. Reprod.* **2000**, *63*, 953–958. [CrossRef]
16. Pallé, A.; Montero, M.; Fernández, S.; Tezanos, P.; de Las Heras, J.A.; Luskey, V.; Birnbaumer, L.; Zufall, F.; Chamero, P.; Trejo, J.L. Gαi2(+) vomeronasal neurons govern the initial outcome of an acute social competition. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 894. [CrossRef]

17. Villafranca-Faus, M.; Vila-Martín, M.E.; Esteve, D.; Merino, E.; Teruel-Sanchís, A.; Cervera-Ferri, A.; Martínez-Ricós, J.; Lloret, A.; Lanuza, E.; Teruel-Martí, V. Integrating pheromonal and spatial information in the amygdalo-hippocampal network. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 5286. [CrossRef] [PubMed]
18. Del Punta, K.; Leinders-Zufall, T.; Rodriguez, I.; Jukam, D.; Wysocki, C.J.; Ogawa, S.; Zufall, F.; Mombaerts, P. Deficient pheromone responses in mice lacking a cluster of vomeronasal receptor genes. *Nature* **2002**, *419*, 70–74. [CrossRef]
19. Dulac, C.; Wagner, S. Genetic analysis of brain circuits underlying pheromone signaling. *Annu. Rev. Genet.* **2006**, *40*, 449–467. [CrossRef] [PubMed]
20. Brennan, P.A. The vomeronasal system. *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 546–555. [CrossRef]
21. Brennan, P.A.; Zufall, F. Pheromonal communication in vertebrates. *Nature* **2006**, *444*, 308–315. [CrossRef]
22. Zufall, F.; Leinders-Zufall, T. Mammalian pheromone sensing. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2007**, *17*, 483–489. [CrossRef]
23. Young, J.M.; Massa, H.F.; Hsu, L.; Trask, B.J. Extreme variability among mammalian V1R gene families. *Genome Res.* **2010**, *20*, 10–18. [CrossRef]
24. Rodriguez, I.; Del Punta, K.; Rothman, A.; Ishii, T.; Mombaerts, P. Multiple new and isolated families within the mouse superfamily of V1r vomeronasal receptors. *Nat. Neurosci.* **2002**, *5*, 134–140. [CrossRef]
25. Grus, W.E.; Zhang, J. Rapid turnover and species-specificity of vomeronasal pheromone receptor genes in mice and rats. *Gene* **2004**, *340*, 303–312. [CrossRef]
26. Meisami, E.; Bhatnagar, K.P. Structure and diversity in mammalian accessory olfactory bulb. *Microsc. Res. Tech.* **1998**, *43*, 476–499. [CrossRef]
27. Salazar, I.; Sánchez-Quinteiro, P.; Alemañ, N.; Cifuentes, J.M.; Troconiz, P.F. Diversity of the vomeronasal system in mammals: The singularities of the sheep model. *Microsc. Res. Tech.* **2007**, *70*, 752–762. [CrossRef]
28. Hughes, L. *Meerkats: Essential Wildlife*; Character-19 ed.: Swindon, UK, 2020.
29. Mausbach, J.; Goncalves, I.B.; Heistermann, M.; Ganswindt, A.; Manser, M.B. Meerkat close calling patterns are linked to sex, social category, season and wind, but not fecal glucocorticoid metabolite concentrations. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0175371. [CrossRef] [PubMed]
30. Wadewitz, P. Olfactory Discrimination of Predators and Conspecifics in Meerkats (*Suricata suricatta*). Master's Thesis, University of Zurich, Zurich, Switzerland, 2010.
31. Hollén, L.I.; Manser, M.B. Persistence of alarm-call behaviour in the absence of predators: A comparison between wild and captive-born meerkats (*Suricata suricatta*). *Ethology* **2007**, *113*, 1038–1047. [CrossRef]
32. Doolan, S.P.; Macdonald, D.W. Diet and foraging behaviour of group-living meerkats, *Suricata suricatta*, in the southern Kalahari. *J. Zool.* **1996**, *239*, 697–716. [CrossRef]
33. Ewer, R.F. The behaviour of the meerkat, *Suricata suricatta* (Schreber). *Z. Tierpsychol.* **1963**, *20*, 570–607. [CrossRef]
34. Sörensen, I.; Amundin, M.; Laska, M. Meerkats (*Suricata suricatta*) are able to detect hidden food using olfactory cues alone. *Physiol. Behav.* **2019**, *202*, 69–76. [CrossRef] [PubMed]
35. Coombes, H.A.; Stockley, P.; Hurst, J.L. Female chemical signalling underlying reproduction in mammals. *J. Chem. Ecol.* **2018**, *44*, 851–873. [CrossRef] [PubMed]
36. Jordan, N.R.; Cherry, M.I.; Manser, M.B. Latrine distribution and patterns of use by wild meerkats: Implications for territory and mate defence. *Anim. Behav.* **2007**, *73*, 613–622. [CrossRef]
37. Jordan, N.R. Scent-marking investment is determined by sex and breeding status in meerkats. *Anim. Behav.* **2007**, *74*, 531–540. [CrossRef]
38. Mares, R.; Young, A.J.; Levesque, D.L.; Harrison, N.; Clutton-Brock, T.H. Responses to intruder scents in the cooperatively breeding meerkat: Sex and social status differences and temporal variation. *Behav. Ecol.* **2011**, *22*, 594–600. [CrossRef]
39. Leclaire, S.; Jacob, S.; Greene, L.K.; Dubay, G.R.; Drea, C.M. Social odours covary with bacterial community in the anal secretions of wild meerkats. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 3240. [CrossRef]
40. Leclaire, S.; Nielsen, J.F.; Thavarajah, N.K.; Manser, M.; Clutton-Brock, T.H. Odour-based kin discrimination in the cooperatively breeding meerkat. *Biol. Lett.* **2013**, *9*, 20121054. [CrossRef]
41. Moran, G.; Sorensen, L. Scent marking behavior in a captive group of meerkats (*Suricata suricatta*). *J. Mammal.* **1986**, *67*, 120–132. [CrossRef]
42. Zöttl, M.; Lienert, R.; Clutton-Brock, T.; Millesi, E.; Manser, M.B. The effects of recruitment to direct predator cues on predator responses in meerkats. *Behav. Ecol.* **2013**, *24*, 198–204. [CrossRef]
43. Willey, T.J. The ultrastructure of the cat olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* **1973**, *152*, 211–232. [CrossRef] [PubMed]
44. Nadi, N.S.; Hirsch, J.D.; Margolis, F.L. Laminar distribution of putative neurotransmitter amino acids and ligand binding sites in the dog olfactory bulb. *J. Neurochem.* **1980**, *34*, 138–146. [CrossRef]
45. Choi, J.H.; Lee, C.H.; Yoo, K.Y.; Hwang, I.K.; Lee, I.S.; Lee, Y.L.; Shin, H.C.; Won, M.H. Age-related changes in calbindin-D28k, parvalbumin, and calretinin immunoreactivity in the dog main olfactory bulb. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2010**, *30*, 1–12. [CrossRef]
46. Chengetanai, S.; Bhagwandin, A.; Bertelsen, M.F.; Hård, T.; Hof, P.R.; Spocter, M.A.; Manger, P.R. The brain of the African wild dog. II. The olfactory system. *J. Comp. Neurol.* **2020**, *528*, 3285–3304. [CrossRef]
47. Imam, A.; Bhagwandin, A.; Ajao, M.S.; Spocter, M.A.; Ihunwo, A.O.; Manger, P.R. The brain of the tree pangolin (*Manis tricuspis*). II. The olfactory system. *J. Comp. Neurol.* **2018**, *526*, 2548–2569. [CrossRef]

48. Das, D.; Ghosh, D.; Payel, P.; Mandal, P. *Handbook on Bio-Staining Procedures: A Quick Practical Approach*; OrangeBooks Publication: Chhattisgarh, India, 2020; ISBN 978-93-90169-51-1.
49. Shinohara, H.; Asano, T.; Kato, K. Differential localization of G-proteins Gi and Go in the accessory olfactory bulb of the rat. *J. Neurosci.* **1992**, *12*, 1275–1279. [CrossRef] [PubMed]
50. Jia, C.; Halpern, M. Subclasses of vomeronasal receptor neurons: Differential expression of G proteins (Gi alpha 2 and G (o alpha)) and segregated projections to the accessory olfactory bulb. *Brain Res.* **1996**, *719*, 117–128. [CrossRef]
51. Johnson, G.V.; Jope, R.S. The role of microtubule-associated protein 2 (MAP-2) in neuronal growth, plasticity, and degeneration. *J. Neurosci. Res.* **1992**, *33*, 505–512. [CrossRef] [PubMed]
52. Lee, V.M.-Y.; Otvos, L., Jr.; Carden, M.J.; Hollosi, M.; Dietzschold, B.; Lazzarini, R.A. Identification of the major multiphosphorylation site in mammalian neurofilaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 1998–2002. [CrossRef]
53. Paxinos, G.; Kus, L.; Ashwell, K.W.S.; Watson, C.R.R. *Chemoarchitectonic Atlas of the Rat Forebrain*; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2008.
54. Verhaagen, J.; Oestreicher, A.B.; Gispen, W.H.; Margolis, F.L. The expression of the growth associated protein B50/GAP43 in the olfactory system of neonatal and adult rats. *J. Neurosci.* **1989**, *9*, 683–691. [CrossRef] [PubMed]
55. Rodewald, A.; Gisder, D.; Gebhart, V.M.; Oehring, H.; Jirikowski, G.F. Distribution of olfactory marker protein in the rat vomeronasal organ. *J. Chem. Neuroanat.* **2016**, *77*, 19–23. [CrossRef]
56. Kishimoto, J.; Keverne, E.B.; Emson, P.C. Calretinin, calbindin-D28k and parvalbumin-like immunoreactivity in mouse chemoreceptor neurons. *Brain Res.* **1993**, *610*, 325–329. [CrossRef]
57. Bailey, M.S.; Shipley, M.T. Astrocyte subtypes in the rat olfactory bulb: Morphological heterogeneity and differential laminar distribution. *J. Comp. Neurol.* **1993**, *328*, 501–526. [CrossRef] [PubMed]
58. Alroy, J.; Ucc, A.A.; Goyal, V.; Woods, W. Lectin histochemistry of glycolipid storage diseases on frozen and paraffin-embedded tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.* **1986**, *34*, 501–505. [CrossRef] [PubMed]
59. Salazar, I.; Cifuentes, J.M.; Sánchez-Quinteiro, P. Morphological and immunohistochemical features of the vomeronasal system in dogs. *Anat. Rec.* **2013**, *296*, 146–155. [CrossRef] [PubMed]
60. Salazar, I.; Sánchez-Quinteiro, P. Differential development of binding sites for four lectins in the vomeronasal system of juvenile mouse: From the sensory transduction site to the first relay stage. *Brain Res.* **2003**, *979*, 15–26. [CrossRef]
61. Franceschini, V.; Lazzari, M.; Ciani, F. Lectin cytochemical localisation of glycoconjugates in the olfactory system of the lizards *Lacerta viridis* and *Podarcis sicula*. *Anat. Embryol.* **2000**, *202*, 49–54. [CrossRef]
62. Peters, B.P.; Goldstein, I.J. The use of fluorescein-conjugated *Bandeiraea simplicifolia* B4-isolectin as a histochemical reagent for the detection of alpha-D-galactopyranosyl groups. Their occurrence in basement membranes. *Exp. Cell Res.* **1979**, *120*, 321–334. [CrossRef]
63. Salazar, I.; Sánchez-Quinteiro, P. Lectin binding patterns in the vomeronasal organ and accessory olfactory bulb of the rat. *Anat. Embryol.* **1998**, *198*, 331–339. [CrossRef] [PubMed]
64. Shapiro, L.S.; Ee, P.L.; Halpern, M. Lectin histochemical identification of carbohydrate moieties in opossum chemosensory systems during development, with special emphasis on VVA-identified subdivisions in the accessory olfactory bulb. *J. Morphol.* **1995**, *224*, 331–349. [CrossRef]
65. Pillay, S.; Bhagwandin, A.; Bertelsen, M.F.; Patzke, N.; Engler, G.; Engel, A.K.; Manger, P.R. Regional distribution of cholinergic, catecholaminergic, serotonergic and orexinergic neurons in the brain of two carnivore species: The feliform banded mongoose (*Mungos mungo*) and the caniform domestic ferret (*Mustela putorius furo*). *J. Chem. Neuroanat.* **2017**, *82*, 12–28. [CrossRef]
66. Salazar, I.; Sánchez-Quinteiro, P. The risk of extrapolation in neuroanatomy: The case of the mammalian vomeronasal system. *Front. Neuroanat.* **2009**, *3*, 22. [CrossRef] [PubMed]
67. Gorman, M.L.; Trowbridge, B.J. The Role of Odor in the Social Lives of Carnivores. In *Carnivore Behavior, Ecology, and Evolution*; Gittleman, J.L., Ed.; Cornell University Press: Ithaca, NY, USA, 2019; pp. 57–88. [CrossRef]
68. Alonso, J.R.; Porteros, A.; Crespo, C.; Arévalo, R.; Briñón, J.G.; Weruaga, E.; Aijón, J. Chemical anatomy of the macaque monkey olfactory bulb: NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase activity. *J. Comp. Neurol.* **1998**, *402*, 419–434. [CrossRef]
69. Kondoh, D.; Watanabe, K.; Nishihara, K.; Ono, Y.S.; Nakamura, K.G.; Yuhara, K.; Tomikawa, S.; Sugimoto, M.; Kobayashi, S.; Horiuchi, N.; et al. Histological properties of main and accessory olfactory bulbs in the common hippopotamus. *Brain Behav. Evol.* **2017**, *90*, 224–231. [CrossRef] [PubMed]
70. Kishida, T.; Thewissen, J.; Usip, S.; Suydam, R.S.; George, J.C. Organization and distribution of glomeruli in the bowhead whale olfactory bulb. *PeerJ* **2015**, *3*, e897. [CrossRef]
71. Ngwenya, A.; Patzke, N.; Ihunwo, A.O.; Manger, P.R. Organisation and chemical neuroanatomy of the African elephant (*Loxodonta africana*) olfactory bulb. *Brain. Struct. Funct.* **2011**, *216*, 403–416. [CrossRef]
72. Schröder, H.; Moser, N.; Huggenberger, S. The mouse olfactory system. In *Neuroanatomy of the Mouse*; Springer: Cham, Switzerland, 2020. [CrossRef]
73. Orechio, D.; Aguiar, B.A.; Diniz, G.B.; Bittencourt, J.C.; Haemmerle, C.A.S.; Watanabe, I.S.; Miglino, M.A.; Castelucci, P. Morphological and cellular characterization of the fetal canine (*Canis lupus familiaris*) subventricular zone, rostral migratory stream, and olfactory bulb. *Anat. Rec.* **2018**, *301*, 1570–1584. [CrossRef] [PubMed]

74. Fernández-Flores, F.; García-Verdugo, J.M.; Martín-Ibáñez, R.; Herranz, C.; Fondevila, D.; Canals, J.M.; Arús, C.; Pumarola, M. Characterization of the canine rostral ventricular-subventricular zone: Morphological, immunohistochemical, ultrastructural, and neurosphere assay studies. *J. Comp. Neurol.* **2018**, *526*, 721–741. [CrossRef]
75. Alvarez-Buylla, A.; Garcia-Verdugo, J.M. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J. Neurosci.* **2002**, *22*, 629–634. [CrossRef]
76. Sohn, J.; Orosco, L.; Guo, F.; Chung, S.H.; Bannerman, P.; Mills Ko, E.; Zarbalis, K.; Deng, W.; Pleasure, D. The subventricular zone continues to generate corpus callosum and rostral migratory stream astroglia in normal adult mice. *J. Neurosci.* **2015**, *35*, 3756–3763. [CrossRef]
77. Doetsch, F.; Alvarez-Buylla, A. Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 14895–14900. [CrossRef]
78. Cayre, M.; Canoll, P.; Goldman, J.E. Cell migration in the normal and pathological postnatal mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* **2009**, *88*, 41–63. [CrossRef]
79. Kondoh, D.; Sasaki, M.; Kitamura, N. Age-dependent decrease in glomeruli and receptor cells containing α1-2 fucose glycan in the mouse main olfactory system but not in the vomeronasal system. *Cell Tissue Res.* **2018**, *373*, 361–366. [CrossRef] [PubMed]
80. Jia, C.; Halpern, M. Calbindin D28k, parvalbumin, and calretinin immunoreactivity in the main and accessory olfactory bulbs of the gray short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. *J. Morphol.* **2004**, *259*, 271–280. [CrossRef] [PubMed]
81. Schneider, N.Y.; Fletcher, T.P.; Shaw, G.; Renfree, M.B. Goα expression in the vomeronasal organ and olfactory bulb of the tammar wallaby. *Chem. Senses* **2012**, *37*, 567–577. [CrossRef]
82. Torres, M.V.; Ortiz-Leal, I.; Villamayor, P.R.; Ferreiro, A.; Rois, J.L.; Sánchez-Quinteiro, P. Does a third intermediate model for the vomeronasal processing of information exist? Insights from the macropodid neuroanatomy. *Brain Struct. Funct.* **2021**. [CrossRef]
83. Skeen, L.C.; Hall, W.C. Efferent projections of the main and the accessory olfactory bulb in the tree shrew (*Tupaia glis*). *J. Comp. Neurol.* **1977**, *172*, 1–35. [CrossRef] [PubMed]
84. Park, C.; Ahn, M.; Lee, J.Y.; Lee, S.; Yun, Y.; Lim, Y.K.; Taniguchi, K.; Shin, T. A morphological study of the vomeronasal organ and the accessory olfactory bulb in the Korean roe deer, *Capreolus pygargus*. *Acta Histochem.* **2014**, *116*, 258–264. [CrossRef]
85. Mackay-Sim, A.; Duvall, D.; Graves, B.M. The West Indian manatee (*Trichechus manatus*) lacks a vomeronasal organ. *Brain Behav. Evol.* **1985**, *27*, 186–194. [CrossRef] [PubMed]
86. Trotier, D.; Eloit, C.; Wassef, M.; Talmain, G.; Bensimon, J.L.; Døving, K.B.; Ferrand, J. The vomeronasal cavity in adult humans. *Chem. Senses* **2000**, *25*, 369–380. [CrossRef]
87. Salazar, I.; Sánchez-Quinteiro, P.; Cifuentes, J.M.; Lombardero, M. The accessory olfactory bulb of the mink, *Mustela vison*: A morphological and lectin histochemical study. *Anat. Histol. Embryol.* **1998**, *27*, 297–300. [CrossRef] [PubMed]
88. Kelliher, K.R.; Baum, M.J.; Meredith, M. The ferret's vomeronasal organ and accessory olfactory bulb: Effect of hormone manipulation in adult males and females. *Anat. Rec.* **2001**, *263*, 280–288. [CrossRef]
89. Frahm, H.D.; Bhatnagar, K.P. Comparative morphology of the accessory olfactory bulb in bats. *J. Anat.* **1980**, *130*, 349–365.
90. Salazar, I.; Sánchez-Quinteiro, P. A detailed morphological study of the vomeronasal organ and the accessory olfactory bulb of cats. *Microsc. Res. Tech.* **2011**, *74*, 1109–1120. [CrossRef] [PubMed]
91. Salazar, I.; Cifuentes, J.M.; Sánchez-Quinteiro, P.; García Caballero, T. Structural, morphometric, and immunohistological study of the accessory olfactory bulb in the dog. *Anat. Rec.* **1994**, *240*, 277–285. [CrossRef]
92. Nakajima, T.; Sakaue, M.; Kato, M.; Saito, S.; Ogawa, K.; Taniguchi, K. Immunohistochemical and enzyme-histochemical study on the accessory olfactory bulb of the dog. *Anat. Rec.* **1998**, *252*, 393–402. [CrossRef]
93. Riddell, P.; Paris, M.C.J.; Joonè, C.J.; Pageat, P.; Paris, D.B.B.P. Appeasing pheromones for the management of stress and aggression during conservation of wild canids: Could the solution be right under our nose? *Animals* **2021**, *11*, 1574. [CrossRef]
94. Pageat, P.; Gaultier, E. Current research in canine and feline pheromones. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* **2003**, *33*, 187–211. [CrossRef]
95. Kaminski, J.; Marshall-Pescini, S. *The Social Dog: Behaviour and Cognition*; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2014.
96. Cajal, S.R. Textura del lobulo olfativo accesorio. *Rev. Micros.* **1902**, *1*, 141–150.
97. Jawlowski, H. On the bulbus olfactorius and bulbus olfactorius accessorius of some mammals. *Lub. Uniw. Marii Curie-Sklodowskiej Roczniki. Annls Dzialc Nauk. Biol.* **1956**, *10*, 67–86.
98. Miodonski, R. Bulbus olfactorius of the dog (*Canis familiaris*). *Acta Biol. Cracov.* **1968**, *11*, 65–75.
99. Salazar, I.; Barber, P.C.; Cifuentes, J.M. Anatomical and immunohistological demonstration of the primary neural connections of the vomeronasal organ in the dog. *Anat. Rec.* **1992**, *233*, 309–313. [CrossRef]
100. Broom, R. A contribution to the comparative anatomy of the mammalian organ of Jacobson. *Trans. R. Soc. Edinb.* **1897**, *39*, 231–255. [CrossRef]
101. Wöhrmann-Repenning, A. Functional aspects of the vomeronasal complex in mammals. *Zool. Jb. Anat.* **1991**, *121*, 71–80.
102. Sanchez-Villagra, M.R. Ontogenetic and phylogenetic transformations of the vomeronasal complex and nasal floor elements in marsupial mammals. *Zool. J. Linnean Soc.* **2001**, *131*, 459–479. [CrossRef]
103. Dulac, C.; Torello, A.T. Molecular detection of pheromone signals in mammals: From genes to behaviour. *Nat. Rev. Neurosci.* **2003**, *4*, 551–562. [CrossRef]
104. Suarez, R.; Mpodozis, J. Heterogeneities of size and sexual dimorphism between the subdomains of the lateral-innervated accessory olfactory bulb (AOB) of *Octodon degus* (Rodentia: Hystricognathi). *Behav. Brain Res.* **2009**, *198*, 306–312. [CrossRef]

105. Suarez, R.; Santibáñez, R.; Parra, D.; Coppi, A.A.; Abrahão, L.M.B.; Sasahara, T.H.C.; Mpodozis, J. Share and differential traits in the accessory olfactory bulb of caviomorph rodents with particular reference to the semiaquatic capybara. *J. Anat.* **2011**, *218*, 558–565. [CrossRef]
106. Torres, M.V.; Ortiz-Leal, I.; Villamayor, P.R.; Ferreiro, A.; Rois, J.L.; Sánchez-Quinteiro, P. The vomeronasal system of the newborn capybara: A morphological and immunohistochemical study. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 13304. [CrossRef]
107. Halpern, M.; Shapiro, L.S.; Jia, C. Differential localization of G proteins in the opossum vomeronasal system. *Brain Res.* **1995**, *677*, 157–161. [CrossRef]
108. Suarez, R.; Villalón, A.; Künzle, H.; Mpodozis, J. Transposition and Intermingling of Galphai2 and Galphao afferences into single vomeronasal glomeruli in the Madagascan lesser Tenrec *Echinops telfairi*. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e8005. [CrossRef]
109. Ortiz-Leal, I.; Torres, M.V.; Villamayor, P.R.; Fidalgo, L.; López-Beceiro, A.; Sanchez-Quinteiro, P. Can domestication shape canidae brain morphology? The accessory olfactory bulb of the red fox as a case in point. *Ann. Anat* **2021**, *240*, 151881. [CrossRef] [PubMed]
110. Takigami, S.; Mori, Y.; Ichikawa, M. Projection pattern of vomeronasal neurons to the accessory olfactory bulb in goats. *Chem. Senses* **2000**, *25*, 387–393. [CrossRef]
111. Takigami, S.; Mori, Y.; Tanioka, Y.; Ichikawa, M. Morphological evidence for two types of mammalian vomeronasal system. *Chem. Senses* **2004**, *29*, 301–310. [CrossRef] [PubMed]
112. Suarez, R.; Fernandez-Aburto, P.; Manger, P.R.; Mpodozis, J. Deterioration of the Gαo vomeronasal pathway in sexually dimorphic mammals. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e26436. [CrossRef] [PubMed]
113. Wekesa, K.S.; Anholt, R.R. Differential expression of G proteins in the mouse olfactory system. *Brain Res.* **1999**, *837*, 117–126. [CrossRef]
114. Salazar, I.; Barrios, A.W.; Sánchez-Quinteiro, P. Revisiting the vomeronasal system from an integrated perspective. *Anat. Rec.* **2016**, *299*, 1488–1491. [CrossRef]
115. Bock, P.; Rohn, K.; Beineke, A.; Baumgärtner, W.; Wewetzer, K. Site-specific population dynamics and variable olfactory marker protein expression in the postnatal canine olfactory epithelium. *J. Anat.* **2009**, *215*, 522–535. [CrossRef]
116. Villamayor, P.R.; Cifuentes, J.M.; Quintela, L.; Barcia, R.; Sánchez-Quinteiro, P. Structural, morphometric and immunohistochemical study of the rabbit accessory olfactory bulb. *Brain Struct. Funct.* **2020**, *225*, 203–226. [CrossRef]
117. Shnayder, L.; Schwanzel-Fukuda, M.; Halpern, M. Differential OMP expression in opossum accessory olfactory bulb. *Neuroreport* **1993**, *5*, 193–196. [CrossRef]
118. Ramakers, G.J.; Verhaagen, J.; Oestreicher, A.B.; Margolis, F.L.; van Bergen en Henegouwen, P.M.; Gispen, W.H. Immunolocalization of B-50 (GAP-43) in the mouse olfactory bulb: Predominant presence in preterminal axons. *J. Neurocytol.* **1992**, *21*, 853–869. [CrossRef]
119. Salazar, I.; Sánchez-Quinteiro, P.; Cifuentes, J.M.; Troconiz, P.F. General organization of the perinatal and adult accessory olfactory bulb in mice. *Anat. Rec.* **2006**, *288*, 1009–1025. [CrossRef] [PubMed]
120. Dehmelt, L.; Halpain, S. The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol.* **2005**, *6*, 204. [CrossRef] [PubMed]
121. Galliano, E.; Hahn, C.; Browne, L.P.; Villamayor, P.R.; Tufo, C.; Crespo, A.; Grubb, M.S. Brief sensory deprivation triggers cell type-specific structural and functional plasticity in olfactory bulb neurons. *J. Neurosci.* **2021**, *41*, 2135–2151. [CrossRef]
122. Ashwell, K.W. Chemoarchitecture of the monotreme olfactory bulb. *Brain Behav. Evol.* **2006**, *67*, 69–84. [CrossRef] [PubMed]
123. Allen, N.J.; Lyons, D.A. Glia as architects of central nervous system formation and function. *Science* **2018**, *362*, 181–185. [CrossRef]
124. Lazzari, M.; Bettini, S.; Franceschini, V. Immunocytochemical characterisation of ensheathing glia in the olfactory and vomeronasal systems of *Ambystoma mexicanum* (Caudata: Ambystomatidae). *Brain Struct. Funct.* **2016**, *221*, 955–967. [CrossRef]
125. Smithson, L.J.; Kawaja, M.D. A comparative examination of biomarkers for olfactory ensheathing cells in cats and guinea pigs. *Brain Res.* **2009**, *1284*, 41–53. [CrossRef]
126. Jacobowitz, D.M.; Winsky, L. Immunocytochemical localization of calretinin in the forebrain of the rat. *J. Comp. Neurol.* **1991**, *304*, 198–218. [CrossRef]
127. Porteros, A.; Arévalo, R.; Crespo, C.; García-Ojeda, E.; Briñón, J.G.; Aijón, J.; Alonso, J.R. Calbindin D-28k immunoreactivity in the rat accessory olfactory bulb. *Brain Res.* **1995**, *689*, 93–100. [CrossRef]
128. Jia, C.; Halpern, M. Calbindin D28K immunoreactive neurons in vomeronasal organ and their projections to the accessory olfactory bulb in the rat. *Brain Res.* **2003**, *977*, 261–269. [CrossRef]
129. Larriva-Sahd, J. Cytological organization of the alpha component of the anterior olfactory nucleus and olfactory limbus. *Front. Neuroanat.* **2012**, *6*, 23. [CrossRef] [PubMed]
130. Shinoda, K.; Ohtsuki, T.; Nagano, M.; Okumura, T. A possible functional necklace formed by placental antigen X-P2-immunoreactive and intensely acetylcholinesterase-reactive (PAX/IAE) glomerular complexes in the rat olfactory bulb. *Brain Res.* **1993**, *618*, 160–166. [CrossRef]
131. Zheng, L.M.; Ravel, N.; Jourdan, F. Topography of centrifugal acetylcholinesterase-positive fibres in the olfactory bulb of the rat: Evidence for original projections in atypical glomeruli. *Neuroscience* **1987**, *23*, 1083–1093. [CrossRef]
132. Kinzinger, J.H.; Johnson, E.W.; Bhatnagar, K.P.; Bonar, C.J.; Burrows, A.M.; Mooney, M.P.; Siegel, M.I.; Smith, T.D. Comparative study of lectin reactivity in the vomeronasal organ of human and nonhuman primates. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* **2005**, *284*, 550–560. [CrossRef] [PubMed]

133. Salazar, I.; Sánchez-Quinteiro, P.; Lombardero, M.; Cifuentes, J.M. Histochemical identification of carbohydrate moieties in the accessory olfactory bulb of the mouse using a panel of lectins. *Chem. Senses* **2001**, *26*, 645–652. [CrossRef]
134. Salazar, I.; Sánchez-Quinteiro, P.; Lombardero, M.; Cifuentes, J.M. A descriptive and comparative lectin histochemical study of the vomeronasal system in pigs and sheep. *J. Anat.* **2000**, *196*, 15–22. [CrossRef]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.4 PUBLICACIÓN NÚMERO 4

Torres, M. V., Ortiz-Leal, I., Ferreiro, A., Rois, J. L., & Sanchez-Quinteiro, P. Immunohistological study of the unexplored vomeronasal organ of an endangered mammal, the dama gazelle (*Nanger dama*). *Microscopy Research and Technique* 86: 1206–1233 (2023).

https://doi.org/10.1002/jemt.24392

Revista: Microscopy Research and Technique

Año de publicación: 2023

Editorial: Wiley Analytical Science

ISSN:

Citas en Google Scholar: 0

Índices de calidad de la revista:

Factor de impacto (2023): 2.5

Categoría (2023):

Anatomy & Morphology Q1 (5/20)

Contribución del doctorando: M. V. T. diseñó la investigación, realizó el trabajo, analizó y discutió los resultados y escribió el artículo.

Autorización de la revista/editorial: Contenido reproducido bajo las condiciones de Copyright (2023) Creative Commons Attribution (CC BY 4.0).

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.
© 2023 The Authors. *Microscopy Research and Technique* published by Wiley Periodicals LLC.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Received: 9 May 2023 | Revised: 11 July 2023 | Accepted: 15 July 2023

DOI: 10.1002/jemt.24392

RESEARCH ARTICLE

MICROSCOPY RESEARCH & TECHNIQUE WILEY

Immunohistological study of the unexplored vomeronasal organ of an endangered mammal, the dama gazelle (*Nanger dama*)

Mateo V. Torres[1] | Irene Ortiz-Leal[1] | Andrea Ferreiro[2] | José Luis Rois[2] | Pablo Sanchez-Quinteiro[1]

[1]Department of Anatomy, Animal Production and Clinical Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary, University of Santiago de Compostela, Lugo, Spain

[2]Marcelle Nature Park, Outeiro de Rei, Lugo, Spain

Correspondence
Pablo Sanchez-Quinteiro, Department of Anatomy, Animal Production, and Clinical Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary, University of Santiago de Compostela, Av Carballo Calero s/n, 27002 Lugo, Spain.
Email: pablo.sanchez@usc.es

Funding information
Consello Social Universidade de Santiago de Compostela, Grant/Award Number: 2022-PU004

Review Editor: Alberto Diaspro

Abstract

Dama gazelle is a threatened and rarely studied species found primarily in northern Africa. Human pressure has depleted the dama gazelle population from tens of thousands to a few hundred individuals. Since 1970, a founder population consisting of the last 17 surviving individuals in Western Sahara has been maintained in captivity, reproducing naturally. In preparation for the future implementation of assisted reproductive technology, certain aspects of dama gazelle reproductive biology have been established. However, the role played by semiochemical-mediated communications in the sexual behavior of dama gazelle remains unknown due partially to a lack of a neuroanatomical or morphofunctional characterization of the dama gazelle vomeronasal organ (VNO), which is the sensory organ responsible for pheromone processing. The present study characterized the dama gazelle VNO, which appears fully equipped to perform neurosensory functions, contributing to current understanding of interspecies VNO variability among ruminants. By employing histological, lectin-histochemical, and immunohistochemical techniques, we conducted a detailed morphofunctional evaluation of the dama gazelle VNO along its entire longitudinal axis. Our findings of significant structural and neurochemical transformation along the entire VNO suggest that future studies of the VNO should take a similar approach. The present study contributes to current understanding of dama gazelle VNO, providing a basis for future studies of semiochemical-mediated communications and reproductive management in this species.

Abbreviations: Aa, arteries; AB, alcian blue; AOB, accessory olfactory bulb; BP, buccal papillae; BSA, bovine serum albumin; CB, calbindin; CR, calretinin; CYK8, cytokeratin 8; DAB, diaminobenzidine; DP, dental pad; EN, neuron-specific enolase; HE, hematoxylin–eosin; HRP, horseradish peroxidase; IB, incisive bone; ID, incisive duct; IP, incisive papilla; LEA, *Lycopersicon esculentum* agglutinin; Lp, lamina propria; MCV, mucomicrovillar complex; NCd, caudal nasal nerve; NVN, vomeronasal nerves; OMP, olfactory marker protein; PAS, periodic acid Schiff; PGP 9.5, protein gene product 9.5; PR, palatal rugae; PV, parvalbumin; RE, respiratory epithelium; RM, respiratory mucosa; SBA, soybean agglutinin; SC, septal cartilage; SE, sensory epithelium; SG, secretagogin; STA, *Solanum tuberosum* agglutinin; UEA, *Ulex europaeus* agglutinin; V, vomer bone; V1R, vomeronasal receptor 1; V2R, vomeronasal receptor 2; VC, vomeronasal cartilage; VD, vomeronasal duct; VG, vomeronasal gland; VNO, vomeronasal organ; VNS, vomeronasal system; VR, ventral recess; Vv, veins; VVA, *Vicia villosa* agglutinin.

Mateo V. Torres and Irene Ortiz-Leal are joint first authors.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.
© 2023 The Authors. *Microscopy Research and Technique* published by Wiley Periodicals LLC.

Research Highlights

- This exhaustive immunohistological study of the vomeronasal organ (VNO) of the dama gazelle provides the first evidence of notable differences in the expression of neuronal markers along the rostrocaudal axis of the VNO.
- This provides a morphological basis for the implementation of pheromones in captive populations of dama gazelle.

KEYWORDS
chemocommunication, G-proteins, immunohistochemistry, lectins, vomeronasal

1 | INTRODUCTION

Dama gazelle (*Nanger dama*), found primarily in northern Africa, is one of the most threatened and rarely studied gazelle species (Abáigar et al., 2019). Unique physiological, ecological, and behavioral adaptations allow dama gazelle, a member of the Sahelo-Saharian ungulate family, to thrive in the arid and semi-arid environments of north Africa (Durant et al., 2014). Three subspecies of dama gazelle can be distinguished according to their geographic distribution and coat color: addra gazelle (*Nanger dama ruficollis* Smith, 1827), mhorr gazelle (*Nanger dama mhorr* Bennett, 1833), and dama gazelle (*Nanger dama dama* Pallas, 1766).

Human pressures, including habitat degradation associated with increased grazing by domestic livestock (Devillers et al., 2005) and intense hunting activity (Cloudsley-Thompson, 1992; Grettenberger & Newby, 1986), have depleted the dama gazelle population. Currently, dama gazelle is considered a critically endangered species and is on the red list of the International Union for Conservation of Nature. Since 1970, a founder population of the last 17 surviving individuals from Western Sahara has been maintained in captivity (Alados et al., 1988), where this species has reproduced naturally (Holt et al., 1996). The remaining wild populations are very small and extremely fragmented (Lamarque et al., 2007), and the prospects of dama gazelle are not expected to improve in the future. The quality of its habitat is expected to continue deteriorating, and the hunting activity that has severely undermined its population remains uncurbed (Bronson, 2009). Additionally, frequent fights between males have been reported in this species when populations are reintroduced into the natural habitat (Cassinello & Pieters, 2000). In the specific case of the mohrr subspecies, which is the subject of this study, it has been considered extinct in the wild since 1968. In Morocco and Senegal, there are small populations in semi-freedom conditions, from reintroductions that were made from the captive population, which comes from four founder specimens, one male and four females. At present, the population of this subspecies exceeds 400 individuals, distributed in different zoos in Europe, the United States, and the Arabian Peninsula.

Maintaining sustainable populations of endangered wildlife species is challenging, and dama gazelle maintenance is even more difficult due to the issue described above. Because reproduction is fundamental to species survival, understanding the reproductive mechanisms of endangered species is a high priority for conservation efforts. Enormous differences in the specific reproductive mechanisms exist across species, even among species that belong to the same phylogenetic clade (i.e., family; Wildt et al., 2001). Although certain aspects of dama gazelle reproductive biology have been established in preparation for the future implementation of assisted reproductive technology (Arregui et al., 2021; Pickard et al., 2001, 2003; Wojtusik et al., 2017), to our knowledge, no information exists regarding the role played by semiochemical-mediated communications in the sexual behavior and reproductive physiology of dama gazelle. Sexual attraction; mother–young interactions; estrus indication, induction and synchronization; puberty acceleration; postpartum anestrus; hormonal stimulation; and penile erections are all influenced by pheromones in ruminants (Archunan et al., 2014). Pheromones are also involved in stress regulation mechanisms in mammals. Therefore, pheromones may be able to reduce male aggressiveness when species are reintroduced to native habitats (Archer et al., 2022).

There is plenty of scope for the application of pheromones to the reproduction and management of dama gazelle populations; however, effective pheromone application first requires the neuroanatomical and morphofunctional characterization of the dama gazelle vomeronasal organ (VNO), the sensory organ responsible for processing semiochemicals as pheromones (Kunkhyen et al., 2017; Powers & Winans, 1975), kairomones (Fortes-Marco et al., 2013; Isogai et al., 2011), and major histocompatibility complex molecules (Leinders-Zufall et al., 2000, 2014). The VNO consists of two tubular, blind-ending, elongated structures located at the base of the nasal septum (Poran, 1998). The vomeronasal duct (VD) is located inside the VNO and establishes a direct communication with the nasopalatine duct and through it with the external environment (Takami, 2002). The VD is lined by vomeronasal epithelium, composed of pheromone-sensing receptor neurons (Eisthen, 1992; Zufall et al., 2002). Pheromones enter through the nasal or oral cavities, dissolve in mucus, and enter the VNO, where they activate the vomeronasal neuroepithelium (Sankarganesh et al., 2022). Transduction occurs in the neuroreceptors of the vomeronasal epithelium, and the pheromone signal is conveyed by vomeronasal nerves (NVN) to the accessory olfactory bulb (AOB), which serves as the initial central

nervous system center for integrating pheromonal information (Halpern, 1987; Mori, 1993; Ortiz-Leal et al., 2022). The morphological and immunohistochemical study of the dama gazelle VNO will answer questions regarding the existence of functional communications between the VNO and the environment and whether the VNO is fully equipped for neurosensory functions, which requires a complete external envelope, a differentiated neuroepithelium, and a parenchyma with the necessary glandular, vascular, and nervous elements (Salazar & Quinteiro, 1998; Salazar, Sánchez Quinteiro, et al., 1997).

Dama gazelle belong to the order Artiodactyla, suborder Ruminantia, and infraorder Pecora. Within Pecora, dama gazelle belong to Bovidae family, which has the largest number of species. Other families in this group are the Antilocapridae (pronghorns), Giraffidae, Moschidae (musk deer), and Cervidae. Among these families, anatomical and histological studies have been conducted in the giraffe VNO (Hart & Hart, 2023; Kondoh, Nakamura, et al., 2017), and a specific study of glycoconjugates was conducted in the musk deer VNO (Kondoh et al., 2020). The Cervidae family has been studied more extensively, and reindeer (*Rangifer tarandus*) (Bertmar, 1981), elk (*Alces alces*) (Vedin et al., 2010), sika deer (*Cervus nippon*) (Matsubara et al., 2019), and Korean roe deer (*Capreolus pygargus*) (Park et al., 2014; Shin et al., 2017) have all been found to feature functional VNOs.

Although more extensive studies have been conducted in the bovid VNO, these studies have focused on domestic species, such as cow (*Bos taurus coreanae*) (Adams, 1986; Jacobs et al., 1981; Jang et al., 2021; Salazar et al., 2008; Taniguchi & Mikami, 1985), goat (*Capra aegagrus hircus*) (Ladewig & Hart, 1980; Park et al., 2013; Yang et al., 2021), and sheep (*Ovis orientalis aries*) (Barrios et al., 2014; Ibrahim, 2018; Ibrahim et al., 2013; Kratzing, 1971; Salazar et al., 1998, 2000; Salazar et al., 2007; Salazar, Lombardero, Alemañ, & Sánchez Quinteiro, 2003), with few studies examining the VNOs of wild bovids. However, substantial differences between wild and domestic bovids were discovered in the investigation of alcelaphine antelopes. Three of the antelope species studied, *Damaliscus iunatus*, *Alcelaphus buscelaphus*, and *Connochaetes taurinus*, either lacked the flehmen response or had no direct communication between the oral cavity and the VNO via the incisive duct (ID), despite a general histology study showing a developed VNO (Hart et al., 1988). These striking morphofunctional observations corresponded to a recent study of ancV1R gene expression (Zhang & Nikaido, 2020), which is considered to be a reliable diagnostic indicator of VNO function. AncV1R expression was inactivated in seals, sea otter, giant otter, fossa, owl monkey, and alcelaphine antelopes. Beyond antelopes, information regarding VNO function in wild ruminants is limited to the morphofunctional study of the water buffalo (*Bubalus bubalis*) VNO (Emam et al., 2016), the study of glandular secretions by *Gazella subgutturosa* (Abood & Hussein, 2018), and a computerized tomographic study of the saiga antelope (*Saiga tatarica*) nasal cavity, which revealed the presence of a VNO (Clifford & Witmer, 2004). These observations reveal wide morphological diversity in the family Bovidae, indicating that the extraction of information regarding the anatomy and histology of the vomeronasal system (VNS) across species can be challenging and risky (Salazar et al., 2016).

The present study was designed to define the morphological and immunohistochemical characteristics of the dama gazelle VNO. This study serves as the first necessary step for implementing reproductive species management using chemical communication and will contribute to filling existing gaps in knowledge regarding VNO function within the family Bovidae. We conducted a comprehensive morphofunctional study of the dama gazelle VNO using histological, histochemical, and immunohistochemical techniques. We performed an exhaustive study along the entire longitudinal axis of the VNO, evaluating differences in the microscopic structures and immunohistochemical labeling patterns along this axis. The wide range of differences that we found suggests that future studies of the VNO should take a similar approach and highlights the important structural and neurochemical transformations exhibited across the entire VNO.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Samples

To carry out our study, we had a healthy 11-month-old male dama gazelle, subspecies mhorr (*Nanger dama mhorr*), which was donated by the Natural Park "Marcelle Natureza" (Outeiro de Rei, Spain) due to its death by accidental causes, specifically a neck fracture when the animal was engaged in social play. The animal was part of a breeding program to create reproductive groups so that the offspring can be transferred to progressive and controlled pre-release facilities in their native habitat. In order to be successful in the repopulation, the behavior and living conditions in the park are as similar as possible to those in their natural habitat.

Less than 12 h after the animal's death, the head was separated from the carcass and the skin, tongue, jaws, teeth, nose, and eyes were removed. A cross-section was made with the aid of a rotary saw to separate the snout, where the VNOs are located, from the rest of the skull. In the snout sample, the bony sides of the nasal cavity and the nasal turbinates were removed. This allowed to identify the location of the VNOs on both sides of the basal part of the nasal septum. Subsequently, a transverse cut was made to divide the nasal septum centrally to facilitate the entry of the fixative into the VDs. The resulting samples were immersed in freshly prepared Bouin's fluid and, after 24 h, transferred to 70% ethanol. The following day, the VNO was dissected, and multiple cross-sections were made equidistant along their entire length in order to analyze the characteristics of each area. This procedure was carried out under a Zeiss OPMI 1 surgical microscope. The bone tissue surrounding the VNO ventrally and medially was dissected from all samples, with the exception of those at the most rostral levels. These rostral pieces were decalcified for a week to microscopically study the topographic relationship of the VNO with the ID. The decalcifying agent used was Shandon TBD-1 Decalcifier (Thermo,

Pittsburgh, PA), and it was applied while stirring continuously at room temperature. All samples were marked and embedded in paraffin, thus obtaining the corresponding blocks. They were cut with a Leica Reichert Jung microtome with a thickness of 5–7 μm, depending on the tissue to be processed.

2.2 | Histological staining

In order to be able to visualize the different components of the analyzed tissue, we used hematoxylin–eosin (HE) as general staining. Additionally, periodic acid-Schiff (PAS) and alcian blue (AB) stains were used to identify neutral and acidic mucopolysaccharides, respectively.

2.3 | Lectin histochemical staining

Lectins, naturally occurring carbohydrate-binding molecules, can be used to detect glycoconjugates associated with certain cell populations in the tissues tested. For this reason, we have used the following five lectins in our research:

1. UEA (Vector-L1060), which comes from gorse, *Ulex europaeus*, and marks the L-fucose pathway (Kondoh et al., 2018).
2. LEA (Vector-B1175), which comes from tomato, *Lycopersicon esculentum*, and recognizes N-acetyl-glucosamine (Salazar, Lombardero, Cifuentes, et al., 2003).
3. VVA, which is isolated from fodder vetch, *Vicia villosa*, binds specifically to N-acetylgalactosamine structures (Tomiyasu et al., 2018).
4. SBA (Vector-B1235), which comes from fodder soybean, *Glycine max*, binds preferentially to oligosaccharide structures with N-acetylgalactosamine and to galactose residues (Park et al., 2012).
5. STA (Vector-B1165), which is isolated from potato, *Solanum tuberosum*, binds oligomers of N-acetylglucosamine and some oligosaccharides containing N-acetylglucosamine and N-acetylmuramic acid (Chun et al., 2023).

The UEA lectin was employed unmodified and identified with an anti-UEA antibody, whereas the other four lectins, VVA, STL, LEA, and SBA, were biotinylated. The following procedures were followed.

2.3.1 | Biotynilated lectins protocol

(i) The tissular endogenous peroxidase activity was blocked to avoid interference with the final developing step by incubating in a 3% H_2O_2 solution for 10 min. (ii) Sections were incubated for 30 min at room temperature in 2% bovine serum albumin (BSA), which prevents nonspecific binding. (iii) The slides were incubated in a humidified chamber overnight at 4°C in the biotinylated lectin diluted in 0.5% BSA at 1:200. The following day, samples were incubated (iv) for 90 min at room temperature in Vectastain ABC complex (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Finally, (v) the sections were developed by incubating the sections in a solution of 0.05% diaminobenzidine (DAB) and 0.003% H_2O_2 for 5–10 min. The reaction was monitored with the microscope.

2.3.2 | UEA lectin protocol

The protocol for UEA began with the same first two steps. Subsequently, (iii) incubation with UEA lectin (1:60 in 0.5% BSA) was carried out for 1 h at room temperature; (iv) 3 washes of 5 min in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.2). (v) Afterwards the sections were incubated in a humidified chamber (overnight 4°C) in a peroxidase conjugated immunoglobulin against UEA (DAKO, P289; 1:50). Finally, the samples were developed (vi) by incubation in the same DAB solution as that employed in the byotinilated-lectins protocol. Controls were performed for both protocols, both without the addition of lectins and with the preabsorption of lectins, by using an excess amount of the corresponding sugar.

2.4 | Immunohistochemical staining

Using immunohistochemistry, the dama gazelle VNO was examined in-depth. The anti-Gαi2 and anti-Gαo antibodies are particularly useful because they label the transduction cascade for V1R and V2R vomeronasal receptors, respectively (Halpern et al., 1995). Antibodies were also used to detect olfactory marker protein (OMP), which is expressed in mature neurons in both olfactory subsystems (Rodewald et al., 2016). The calcium-binding proteins calbindin (CB), calretinin (CR), parvalbumin (PV), and secretagogin (SG) participate in the regulation of cytosolic free calcium ion concentrations in neurons. The distribution of proteins has previously been recognized as a useful neuronal marker for identifying specific brain regions and discrete neuronal subpopulations (Coppola & Disney, 2018; de Góis Morais et al., 2021; Kishimoto et al., 1993; Pérez-Revuelta et al., 2020). Cytokeratin 8 forms part of the intermediate filament cytoskeleton of epithelial cells. Accordingly, it is an effective marker for olfactory and vomeronasal sustentacular cells (Khan et al., 2021). Enolases are glycolytic enzymes that may be involved in cellular differentiation. γ enolase, specific of the nervous tissue, is a good marker for mature olfactory and vomeronasal neuroreceptor cells (Takahashi et al., 1984). PGP 9.5, also known as ubiquitin C-terminal hydrolase, is highly specific to neurons and to cells of the diffuse neuroendocrine system. In the VNO it identifies neuroreceptor cells but not supporting or basal cells (Taniguchi et al., 1993).

The protocol of the immunohistochemical labeling is explained in detail in Torres et al., 2021. Briefly, the initial step consisted of inhibiting endogenous peroxidase activity with 3% H_2O_2. Then (ii) nonspecific binding was blocked for 30 min using 2.5% normal horse serum from the ImmPRESS Anti-Mouse IgG/Anti-rabbit IgG Reagent Kit (Vector Laboratories, CA, USA). (iii) Subsequently, the primary antibody was added to the corresponding dilution and incubated

overnight (4°C). The following day, (iv) the samples were incubated at room temperature for 20 minutes with the corresponding ImmPRESS VR Polymer HRP anti-rabbit IgG reagent. After (v) rinsing in Tris buffer (0.2 M pH 7.61) for 10 min, (vi) the samples were developed using DAB as a chromogen in the same manner as for lectins.

All immunohistochemical protocols were run with the appropriate controls. In the absence of a positive control from dama gazelle, we reproduced the whole histochemical procedure with mouse tissues known to express the respective antigens. Samples for which the primary antibody was replaced by antibody diluent were used as negative controls.

2.5 | Antibody characterization and specificity

Table 1 gives information on all antibodies, including their suppliers, dilutions, immunogen targets, and Research Resource Identifiers (RRID). In each instance, the immunostaining patterns produced by these antibodies in dama gazelles were comparable to those previously observed in a variety of mammalian species. References pertinent to each antibody are also listed in Table 1.

2.6 | Acquisition of images

The images that make up the different illustrations were taken with a Olympus SC180 digital camera coupled to a Olympus BX50 microscope. Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA) was used to fine-tune brightness and contrast, balance levels, and crop or resize images for presentation. Photomicrographs of the entire VNO were taken as a mosaic of several photographs made with the 10× objective and merged with image-stitching software (PTGui Pro).

TABLE 1 Detailed information on the antibodies used in this study: Species of elaboration, dilution, catalog number, manufacturer, target immunogens, relevant reference for each antibody, Research Resource Identifiers (RRID) codes, and secondary antibody employed.

Antibody	1st Ab species/ dilution	1st Ab catalog number /manufacturer	Immunogen	Reference	RRID	2nd Ab species/dilution, catalog number
Anti-Gαo	Rabbit 1:200	MBL-551	Bovine GTP Binding Protein Gαo subunit	Prince et al. (2009)	AB_591430	ImmPRESS VR HRP Anti-rabbit IgG Reagent MP-6401-15
Anti-Gαi2	Rabbit 1:200	Santa Cruz Biotechnology sc-7276	Peptide mapping within a highly divergent domain of Gαi2 of rat origin	de la Rosa-Prieto et al. (2010)	AB_2111472	ImmPRESS VR HRP Anti-rabbit IgG Reagent MP-6401-15
Anti-CB	Rabbit 1:6000	Swant CB38	Rat recombinant calbindin D-28k	Hermanowicz-Sobieraj et al. (2018)	AB_10000340	ImmPRESS VR HRP Anti-rabbit IgG Reagent MP-6401-15
Anti-CR	Rabbit 1:6000	Swant 7697	Recombinant human calretinin containing a 6-his tag at the N-terminus	Adrio et al. (2011)	AB_2619710	ImmPRESS VR HRP Anti-rabbit IgG Reagent MP-6401-15
Anti-SG	Rabbit 1:1000	Gift from Ludwig Wagner (University of Vienna, Austria)	Recombinant human secretagogin	Alpár et al. (2012)	AB_1079874	ImmPRESS VR HRP Anti-rabbit IgG Reagent MP-6401-15
Anti-PV	Rabbit 1:400	Proteintech 26521-1-AP	Parvalbumin peptide	Hsu et al. (2018)	AB_2880541	ImmPRESS VR HRP Anti-rabbit IgG Reagent MP-6401-15
Anti-OMP	Mouse 1:200	Santa Cruz Biotechnology sc-365818	Amino acids 1–163 human OMP (B-6)	Goncalves and Goldstein (2020)	AB_10842164	ImmPRESS VR HRP Anti-mouse IgG Reagent MP-6402-15
Anti-CYK88	Rabbit 1:200	Proteintech 17514-1-AP	CYK8 peptide	Hou et al. (2015)	AB_2134726	ImmPRESS VR HRP Anti-rabbit IgG Reagent MP-6401-15
Anti-PGP 9.5	Rabbit 1:200	Proteintech 14730-1-AP	UCHL1/PGP9.5 fusion protein Ag6490	Ren et al. (2021)	AB_2210497	ImmPRESS VR HRP Anti-rabbit IgG Reagent MP-6401-15
Anti-EN	Mouse 1:100	Santa Cruz Biotechnology sc-21738	Amino acids 416–433 human γ-enolase	Matayoshi and Otaki (2011)	AB_627513	ImmPRESS VR HRP Anti-mouse IgG Reagent MP-6402-15

Abbreviations: CB, calbindin; CR, calretinin; CYK8, cytokeratin; NE, neuron-specific enolase; HRP, horseradish peroxidase; OMP, olfactory marker protein; PGP 9.5, protein gene product 9.5; PV, parvalbumin; SG, secretagogin.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3 | RESULTS

3.1 | Macroscopic study

The VNO of dama gazelle consists of two tubular, elongated structures located at the base of the nasal septum, extending from the level of the incisive papilla to a level corresponding approximately to the rostral border of the lacrimal bone. To account for any structural or neurochemical alterations that might occur along the longitudinal axis of such a lengthy structure, we conducted a serial histological study, resulting in the definition of 15 transverse levels. These levels are depicted in Figure 1a, which shows a lateral view of the head of a dama gazelle.

In artiodactyls, communication between the VD and the external environment is indirect, requiring the opening of the VD into the ID (also known as the nasopalatine duct). The ID typically opens into the oral cavity via the incisive papilla and extends into the nasal cavity through an aperture in the ventral recess. However, the incisive papilla has not been found in some species of the family Bovidae. Therefore, we assessed whether an incisive papilla was present in dama gazelle to determine whether functional communication could occur between the VD and the ID. Our examination of the dama gazelle hard palate (Figure 1b) revealed the opening of the ID in a well-defined incisive papilla.

The decalcification of the two rostral blocks (L1–L2) allowed for the examination of topographic relationships between the VD and ID,

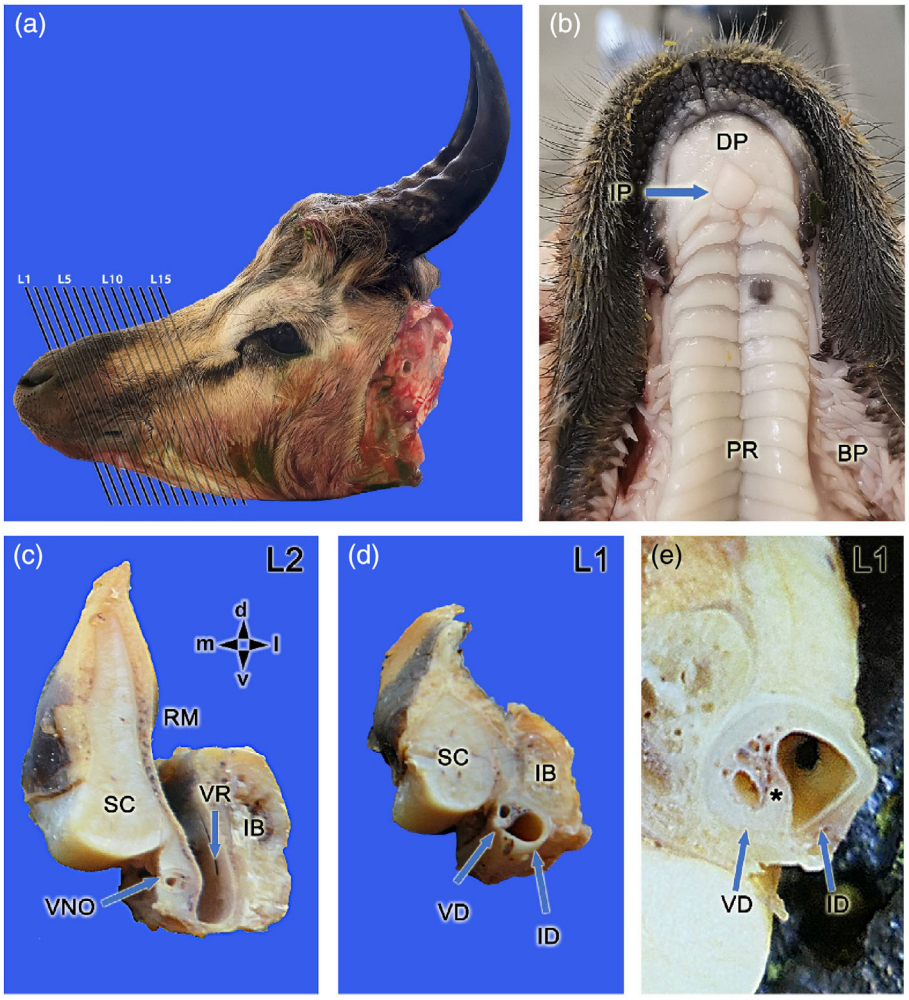

FIGURE 1 Dissection of the dama gazelle vomeronasal organ (VNO). (a) The lateral view of the head displaying the 15 transverse levels that correspond to the histological series depicted in Figure 2. (b) Ventral view of the palate, showing the opening of the incisive duct (ID) in the incisive papilla. (IP). (c–d) Sections of the decalcified nasal cavity at the first two levels, as shown in (a), to study the communication between the VNO and the external environment. The most rostral level (L1) is shown in (d). The wide and lateral ID runs parallel to the smaller vomeronasal duct (VD). Both passages are encased in a common cartilaginous envelope. However, the communication between the VD and the ID has not been established. The topographical relationship with the midline septal cartilage (SC) and the lateral incisive bone (IB) can also be seen. The next caudal level (L2) is shown in (c). The cartilaginous envelope of the VNO is thick, and its dorsal process contacts the SC. At this stage, the ID has opened to the ventral recess of the nasal cavity (VR). (e) Higher magnification of the vomeronasal L1 reveals the unique cartilaginous envelope of both the VNO and the ID. The asterisk indicates the formation of erectile tissue in the VNO, which is made up of numerous blood vessels positioned between the VD and the ID. BP, buccal papillae; DP, dental pad; PR, palatal rugae; RM, respiratory mucosa. Orientation: d, dorsal; l, lateral; m, medial; v, ventral.

in addition to the septal cartilage of the nasal cavity and the incisive bone (Figure 1c,d). The two ducts run parallel to each other, occupying a region that corresponds to the palatal fissure. The ID was considerably larger in caliber than the VD. Despite being separated by a broad band of erectile tissue, both passages are encased in a common cartilaginous envelope (Figure 1e). At the L2 level, the ID opens to the ventral recess of the nasal cavity, whereas the VD remains encased in a large cartilaginous envelope (Figure 1c). The obtained sections did not permit the macroscopic identification of communication between ducts; hence, this issue was not able to be clarified until the serial histologic examination of the VNO was performed.

3.2 | Microscopic study

3.2.1 | Histological study

The serial histological study of the VNO comprised 15 levels (Figure 2), allowing for the discrimination of changes in the shape and dimensions of its three primary components: the VD, the vomeronasal cartilage encapsulating the VD, and the parenchyma between the VD and the cartilage. The use of the term "parenchyma" does not correspond to the classic sense of a parenchymal viscera. The VNO, originating from the ectoderm, is not a viscera. Rather, it corresponds to the definition of the predominant functional component of an organ.

The VNO cartilage consists of a single piece that varies in shape across levels. The cartilage generally consists of a circular section complemented by a prominent dorsal projection that directly contacts the septal cartilage along the entire length of the VNO. The rostral-most part of the VNO cartilage has the clearest circular section, but from L4 to L9, the capsule cavity is slightly flattened dorsoventrally. In the caudal part of the VNO, the cartilage undergoes striking modifications. In particular, at levels L10–L12, a visible increase in the cavity size is observed, coinciding with the end of the VD. After L12, the cartilage acquires a triangular section and undergoes a rapid reduction in its lumen, such that the extent of the parenchyma progressively decreases. At the most caudal level considered (L15), the lumen contains only the main branches of the VNO innervation and irrigation. The remarkable development of the vascular component of the VNO, which occupies the lateral regions of the majority of sections, can be observed in the parenchyma, composed primarily of massive venous sinuses.

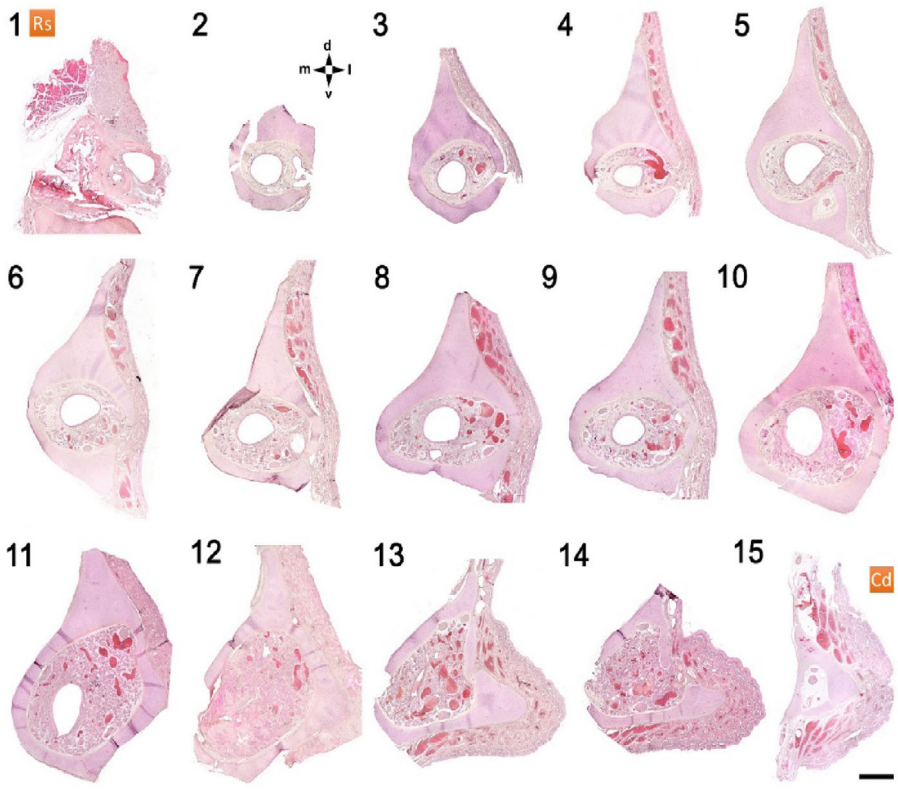

FIGURE 2 Serial histological study, stained with hematoxylin–eosin, enabled the definition of 15 transverse levels of the VNO from rostral (1) to caudal (15). Changes in the shape and dimension of the cartilage and vomeronasal duct are observed throughout the histological series. Variations in the main structural features of the VNO's parenchyma, particularly its vascular component, are noticeable. Level 1 represents the more rostral (Rs) section, depicting the confluence of both vomeronasal and incisive ducts within the palatal fissure. Levels 2 and 3 depict the rostral part of the VNO, while levels 5 and 6 correspond to the central part of the VNO where the two main epithelia lining the vomeronasal duct are already differentiated. Level 10 indicates the caudal part of the VNO where the vomeronasal duct acquires a larger caliber. Level 13 marks the caudal termination of the vomeronasal duct, which is no longer present in the next and last two levels. Directionality is indicated by the following: cd, caudal; d, dorsal; l, lateral; m, medial; rs, rostral; v, ventral. Scale bar: 500 μm.

The serial histological study of the L1 block (Figure 3) demonstrated the existence of functional communication between the VNO and the ID (Figure 3a). At this level, the VD has a much narrower diameter than the ID, and both ducts increase their calibers caudally. No glands are observed in the surrounding parenchyma. Instead, vast venous sinuses were observed. Throughout the entire L1 level, both ducts are enclosed by a single cartilaginous capsule, the medial branch of which contacts the vomer bone (Figure 3c,e). Only in the most rostral sections is the cartilage surrounding the VD separated into two distinct parts (Figure 3a). The epithelial lining of both ducts changes remarkably throughout this rostral level. Rostrally, the VD is covered by a squamous simple epithelium (Figure 3a,c), but more caudally, the VD is covered by a pseudostratified epithelium comprising two cell layers (Figure 3e). Two cell types could be differentiated: large cuboidal cells with more superficial nuclei and elongated cells morphologically similar to neuroreceptors (Figure 3f). Rostrally, the lateral ID consists of a well-developed, stratified squamous epithelium (Figure 3b); however, at the level of communication between the VD and ID, squamous simple epithelium is observed (Figure 3d). At the most caudal sections of the L1 level, the epithelium transitions into a pseudostratified lining that is rich in superficial caliciform cells and resembles the respiratory mucosa (Figure 3g).

At both the L2 and L3 levels, the VD is circular in shape (Figure 4a,d). At the L2 level, the lateral VNO parenchyma contains large venous sinuses (Figure 4a), whereas the remaining parenchyma contains almost no glands or vessels, consisting primarily of connective tissue and a few small branches of the NVN (Figure 4a). The lateral epithelium of the VD shows basal cells for the first time, covered by a pseudostratified epithelium formed by two layers of rounded or oval cells with nuclei darkly stained by hematoxylin staining and individual superficial cells with translucent nuclei (Figure 4b). The medial epithelium shows similar characteristics to those observed at the L1 level, with polyhedral cells containing rounded nuclei in the apical position and a simple layer of basal cells (Figure 4c). At the L3 level the vomeronasal cartilage presents a sharp dorsal projection and encircles the entire VNO. Compared with the previous level, the parenchyma presents the great development of the glandular component, concentrated in the dorsolateral quadrant, together with the venous sinuses (Figure 4d). The lateral epithelium is similar to that observed in the previous level (Figure 4e), whereas changes in the organization of the medial vomeronasal epithelium are observed. The geometrically shaped cells from the previous level are replaced with cells containing elongated nuclei and cytoplasm and arranged in an incipient columnar manner, representing a transition to the typical vomeronasal receptor epithelium (Figure 4f).

Level L5 (Figure 5a–e) corresponds to the central VNO, where the vomeronasal cartilage presents a lateral opening and a ventral recess for the caudal nasal nerve (NCd) is observed (Figure 5a). At this level, the VD adopts a characteristic crescent shape, and this is the first level at which the medial epithelium shows the typical morphology of a full developed sensory epithelium (SE). The basal cells are not very conspicuous, and the neuroreceptor cell somas are large and rounded, containing distinct nuclei, eosinophilic cytoplasm, and

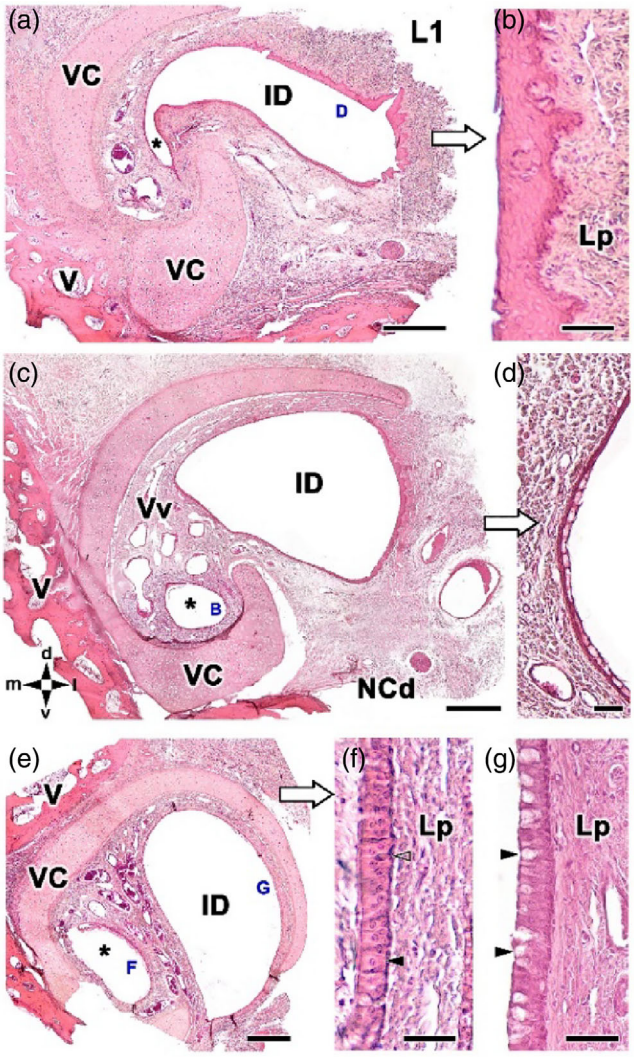

FIGURE 3 Histological study of the communication between the vomeronasal organ (VNO) and the incisive duct (ID). (a) A rostral section in block L1 demonstrates the existence of functional communication between the VNO and the ID (*). In this section, the vomeronasal cartilage (VC) is divided into two distinct parts. Both ducts are enclosed by a single cartilaginous capsule, with its medial branch contacting the vomer bone (V). There are no observed glands in the surrounding parenchyma, but large venous sinuses (Vv) can be seen. The caudal nasal nerve (NCd) runs ventrally to the ID. (b) At higher magnification, the ID is covered by a well-developed stratified squamous epithelium, mainly in the lateral part. (c) In a more caudal section than above, the VD is now complete, although it is noticeably smaller than the ID. (d) Upon closer examination of the VD, it can be observed that it is lined by a layer of simple squamous epithelium. (e) A more caudal section at the L1 level shows the enlargement of the VD. Additionally, the lining of both the vomeronasal and ID has undergone a change, as can be seen in higher magnification images (f) and (g). (f) The vomeronasal epithelium is pseudostratified and consists of two cell layers. Two cell types are differentiated: large cuboidal cells (black arrowhead) and elongated cells (open arrowhead) that appear to be neuroreceptors. (g) In contrast, the ID epithelium is a denser pseudostratified lining with superficial caliciform cells (arrowheads). Stain: hematoxylin–eosin. Lp, lamina propria. Orientation: d, dorsal; l, lateral; m, medial; v, ventral. Scale bars: a, c, e = 500 μm, b, d, f, g = 50 μm.

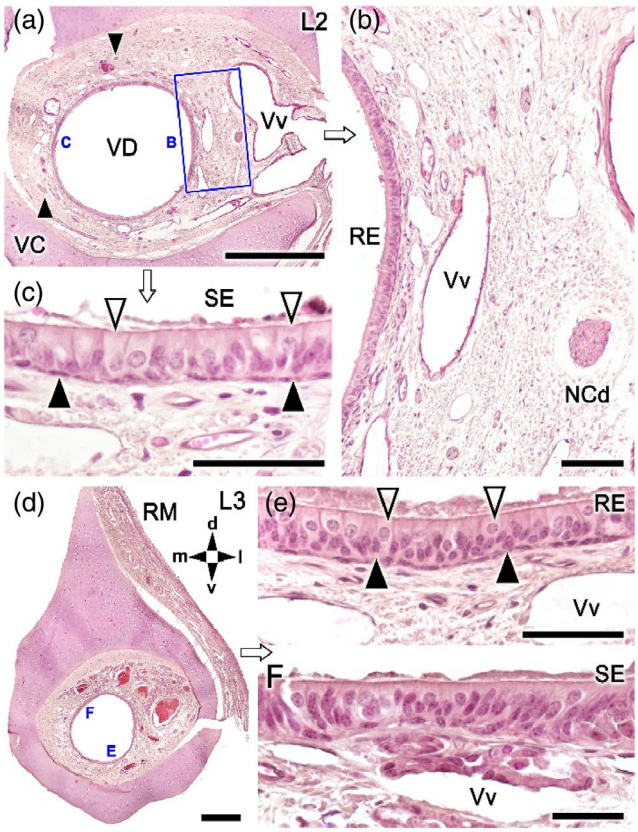

FIGURE 4 Histological study of the vomeronasal organ (VNO) at the rostral levels L2 (a–c) and L3 (d–f). (a) At the L2 level, the VD is circular. The lateral VNO parenchyma contains large venous sinuses that extend into the lateral opening of the vomeronasal cartilage. The rest of the parenchyma has minimal glands or vessels, primarily consisting of connective tissue and a few small branches of the NVN. (b) An enlarged view of the boxed area in (a), showing the RE at higher magnification. The lateral epithelium of the VD shows basal cells for the first time, covered by a pseudostratified epithelium formed by two layers of rounded or oval cells with dense nuclei, stained by hematoxylin staining. Additionally, individual superficial cells with translucent nuclei are present. (c) The medial epithelium shows characteristics similar to those observed at the L1 level. It presents polyhedral cells with rounded nuclei located in the apical position (open arrowhead) and a simple layer of basal cells (black arrowhead). (d) At level 3, the vomeronasal cartilage presents a distinct dorsal projection and encloses the entire VNO. Compared with the previous level, the parenchyma at this level shows significant development of the glandular component, which is concentrated in the dorsolateral quadrant along with the venous sinuses. (e) The lateral epithelium at this level is similar to the one observed in the previous level with superficial cuboidal cells (open arrowheads) and dark nucleated cells (black arrowheads) located in a basal position. (f) The geometrically shaped cells from the previous level are replaced with cells containing elongated nuclei and cytoplasm. These cells are arranged in an incipient columnar manner, representing a transition to the typical vomeronasal receptor epithelium. RE, respiratory epithelium; RM, respiratory mucosa; SE, sensory epithelium; VD, vomeronasal duct; Vv, veins; directionality is indicated by the following: d, dorsal; l, lateral; m, medial; v, ventral. Scale bars: a, d = 500 μm, b = 100 μm, c, e, f = 50 μm.

processes that extend toward the luminal surface (Figure 5b). The sustentacular cells are strongly stained and densely packed close to the luminal surface (Figure 5b). In the respiratory epithelium (RE), a few polyhedral cells containing translucent cytoplasm can be observed in the apical zone. The medial parenchyma is devoid of glands but contains numerous NVN branches (Figure 5d), whereas the lateral region of the VD is connected to tubular glands that open in the dorsal commissure (Figure 5e).

At a more caudal level, L9 (Figure 5f–j), the lateral commissure in the VC is almost completely closed, and the VD has a reduced diameter with a circular shape. The parenchyma shows the increased development of vascular erectile tissue (Figure 5f). The NCd is located within the parenchyma, and numerous thick NVNs run medially. Although the VD lumen no longer displays a crescent shape, three-quarters of the epithelial lining display neuroreceptors (Figure 5g). The SE shows a clear distinction between neuroreceptor cells located in the basal region and the apical sustentacular cells, which contain dense nuclei (Figure 5i,j). The RE (Figure 5h) resembles that at the central level (L5; Figure 5c), although fewer superficial polyhedral cells can be observed at L9.

Figure 6 shows the main histological features of the caudal VNO. At level L10 (Figure 6a–d), the cartilaginous envelope is complete. Compared with level L9, the parenchyma in level 10 is remarkably enlarged by the presence of copious glandular tissue and large blood vessels. The SE and RE are clearly differentiated (Figure 6b,c), and similar to level L9, the SE in level 10 contains clearly defined neuroreceptor cells (Figure 6d). However, the SE in level 10 also contains a higher density of sustentacular cells than the SE in L9. Level L13 (Figure 6e–h) corresponds with the caudal extremity of the VD, and the medial SE and the lateral RE remain clearly differentiated (Figure 6f). In the SE, in addition to neuroreceptor and sustentacular cells, superficial globose cells can be observed (Figure 6g). The basal cells are less numerous at level L13 than in previous levels. The RE maintains its structure and does not contain basal cells (Figure 6h). At level L14 (Figure 6i,j), the parenchyma is composed of venous sinuses, abundant glandular tissue, and nerve bundles, and the VD is absent, but several tubular epithelial structures can be detected, which correspond to the earliest epithelial invaginations that, like gloved fingers, give rise to the VD (Figure 6j). These ducts are lined exclusively with RE. At the most caudal level studied, L15 (Figure 6k), the cartilaginous sheath is triangular in shape and contains branches of the NCd, veins, and arteries.

We also examined horizontal sections of the caudal VNO (Figure 7), revealing how the caudal extremity of the VD gives way to a large parenchymal region rich in glandular tissue and venous sinuses and flanked on both sides by cartilage (Figure 7a). Some vomeronasal glands (VGs) are observed in the ventral parenchyma, but venous sinuses predominate (Figure 7b). At a dorsal level, the NVN has a remarkable number of longitudinal branches (Figure 7c). The glandular tissue is serous in nature (Figure 7d).

A serial histological study was conducted using specific stains for glandular tissue. AB (Figure 8a–c) was used to identify acidic mucins,

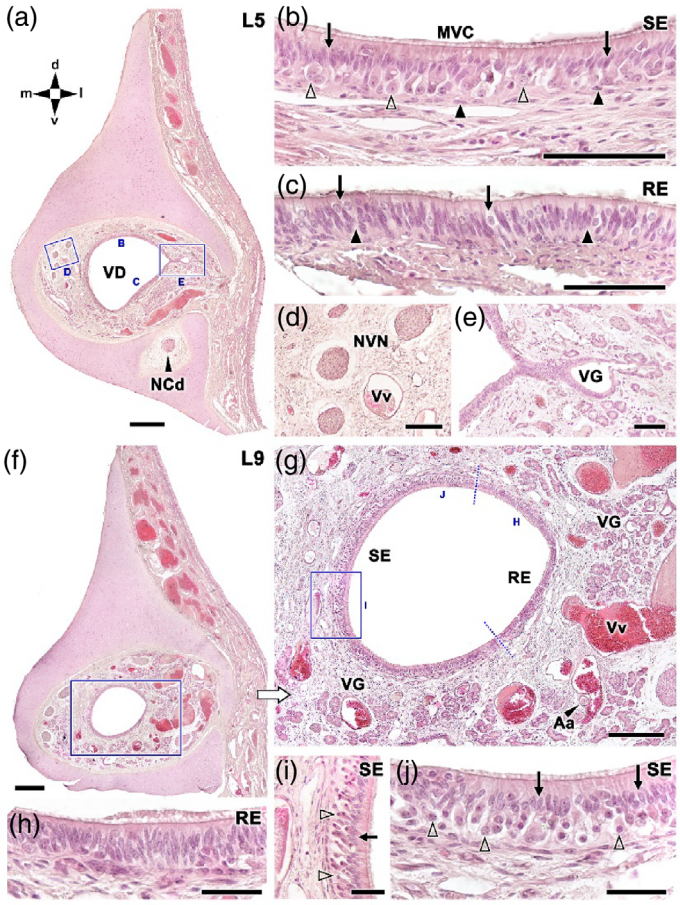

FIGURE 5 Histological features of the central (L5) and caudal (L9) parts of the dama gazelle vomeronasal organ (VNO). (a) Centrally, the most prominent features of the vomeronasal cartilage are its lateral opening and the presence of a ventral recess for the caudal nasal nerve (NCd). At this level, the VD adopts a distinct crescent shape. (b) The medial epithelium displays the typical morphology of a fully developed sensory epithelium. The presence of basal cells is not prominent (black arrowheads), while the soma of neuroreceptor cells (open arrowheads) are rounded with clear nuclei, eosinophilic cytoplasm, and processes extending toward the surface. They are large cells, in contrast to sustentacular cells, which are strongly stained (black arrows), and densely packed near the luminal surface. A mucomicrovillar complex (MVC) covers the luminal surface of the SE. (c) Polyhedral cells with translucent cytoplasm can be observed in the apical zone of the respiratory epithelium (RE) (arrows). Conversely, cells with dark-stained ellipsoidal nuclei can be found throughout the epithelium (arrowheads). (d) The medial parenchyma contains numerous NVN branches. (e) The glandular tissue is located laterally in the parenchyma, and it is less abundant than at the anterior level. Tubular glands (VG) release their secretions into channels that lead to the vomeronasal duct (VD). (f) At a more caudal level, L9, the VC is nearly closed. The VD features a smaller diameter and circular shape, indicating increased development of vascular erectile tissue. The NCd is situated within the parenchyma, and numerous thick NVNs run medially. (g) At higher magnification (inset in (f)), the transitions between the sensory and respiratory epithelia are marked with two dotted dashed lines. Approximately three-quarters of the duct's epithelial lining consists of neuroreceptor cells. (h) The RE resembles that of the central level (L5), although there are fewer polyhedral cells visible. The epithelium's surface has numerous cilia. (i, J) The SE shows a marked differentiation between neuroreceptor cells in the basal part (open arrowheads) and sustentacular cells with densely packed nuclei (black arrows). On the luminal surface of the SE, the presence of microvilli is striking. Aa, arteries; Vv, veins; directionality is indicated by the following: d, dorsal; l, lateral; m, medial; v, ventral. Scale bars: a, f = 250 μm, b = 250 μm, b–e = 100 μm, h–j = 50 μm.

whereas PAS stain (Figure 8d–l) was used to identify neutral mucins in the tissue. Both stains revealed epithelial glands on the surface of the respiratory mucosa of the nasal cavity, the vomeronasal cartilage (Figure 8a,d,l), and the mucomicrovillar complex that covers the luminal surface of the VD epithelium (Figure 8b,j). However, a clear distinction was observed between the types of secretions produced from glands within the VNO parenchyma. Beginning at level L3 (Figure 8f) and extending through the caudal VNO, generalized PAS staining of the glandular component was observed, whereas AB only stained the central VNO (level L6) and was restricted to a small group of glands in the dorsal parenchyma (Figure 8b,c,l). At level L3, only a small group of ventral glands were stained with PAS, whereas by level L4, these VGs extended and occupied most of the dorsal parenchyma. Starting at level L6 and continuing through the caudal VNO (Figure 8d,e), VGs could be found throughout the parenchyma surrounding the VD, filling the spaces between venous sinuses. At the most caudal levels of the VD (Figure 8h,k), PAS-positive glands were highly expressed.

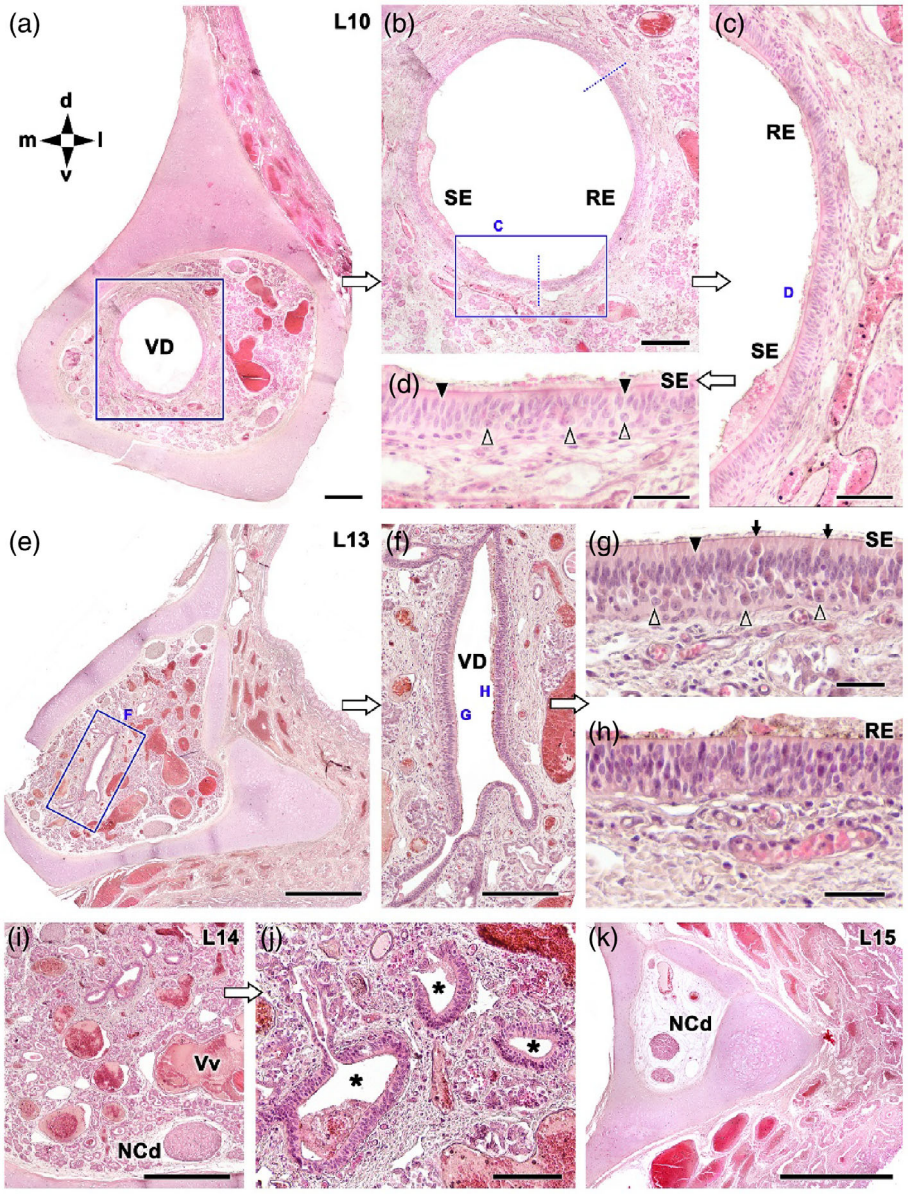

FIGURE 6 Histological features of the caudal levels of the dama gazelle vomeronasal organ (VNO). (a) At level L10, the cartilaginous envelope is complete. In comparison to level L9, the parenchyma in L10 is significantly enlarged owing to the abundant presence of glandular tissue and large blood vessels. (b, c) The SE and RE are clearly differentiated. (d) At higher magnification, the SE is similar to level L9, displaying clearly defined neuroreceptor cells (open arrowheads). However, the SE in level L10 also reveals a higher density of sustentacular cells (black arrowheads). (e) Level L13 corresponds with the caudal extremity of the VD. (f) Even at this more caudal level, the medial sensory and the lateral respiratory epithelia remain clearly differentiated. (g) In the sensory epithelium, aside from the receptor (open arrowhead) and sustentacular cells (black arrowhead), superficial globose cells (arrows) can be observed. Basal cells are not as abundant as in the previous levels. (h) The respiratory epithelium remains structurally intact and does not contain basal cells. (i) At level L14, the parenchyma consists of venous sinuses, abundant glandular tissue, and nerve bundles, with the VD being absent. (j) At higher magnification, tubular epithelial structures (asterisk) can be detected. These structures correspond to the earliest epithelial invaginations, which give rise to the VD, resembling gloved fingers. The ducts are lined exclusively by respiratory epithelium. (k) At the most caudal level studied (L15), the cartilaginous sheath is triangular and contains branches of the caudal nasal nerve (NCd), as well as veins and arteries. RE, respiratory epithelium; SE, sensory epithelium; Vv, veins; directionality is indicated by the following: d, dorsal; l, lateral; m, medial; v, ventral. Scale bars: e, k = 500 μm; a, i = 250 μm; f = 250 μm; b, c, j = 100 μm; d, g, h = 50 μm.

3.2.2 | Immunohistochemical study

The immunolabeling pattern against G protein subunits (Figure 9) is especially revealing because expression of the αi2 and αo subunits in the VNO is thought to correspond to the effective expression of the two major families of vomeronasal receptors, V1R and V2R, respectively.

Gαi2 protein immunolabeling (Figure 9a–k) varies markedly throughout the VNO (level L2). At the most rostral level, L2, Gαi2 can be faintly detected throughout the entire VD epithelium (Figure 9a),

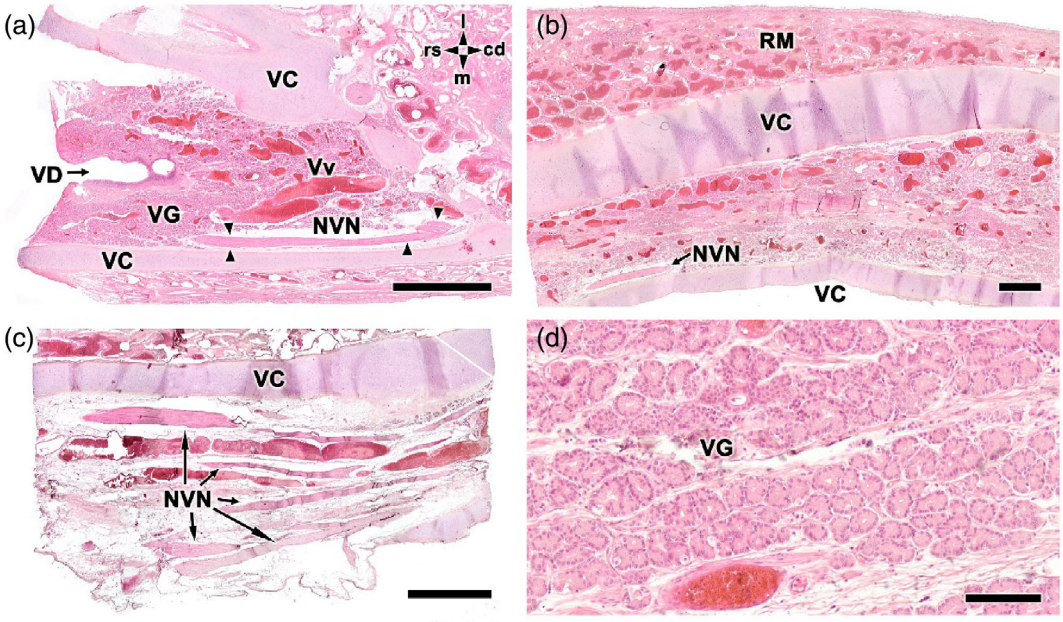

FIGURE 7 Horizontal sections of the caudal vomeronasal organ (VNO). (a) The caudal extremity of the VD transitions into a large parenchymal region rich in glandular tissue and venous sinuses (Vv) flanked by cartilage on both sides. The vomeronasal nerves (NVN) are visible in the medial parenchyma of the organ. (b) Ventrally, the VC remains, and some VG can be seen in the parenchyma; however, venous sinuses predominate. (c) Dorsally, venous sinuses are accompanied by numerous longitudinal branches of the NVNs. (d) Higher magnification view of the serous glandular tissue (VG) in the caudal part of the VNO. RM, respiratory mucosa; directionality is indicated by the following: cd, caudal; l, lateral; m, medial; rs, rostral. Scale bars: a, c = 1 mm, d = 100 μm.

likely due to the presence of scattered cells with neuroepithelial morphology and strongly labeled processes (Figure 9d). At the next level studied (L3), Gαi2 results in strong immunolabeling of the NVN (Figure 9b), which continues through the entire VNO. At the L3 level, neuroreceptor cells remain scattered, but they possess large and strongly stained processes (Figure 9e). At central levels of the VNO (L5 and L6), the difference between Gαi2-immunopositive SE and immunonegative lateral epithelium becomes evident (Figure 9c,g). The SE presents with typical features, including a continuous layer of neuroreceptor-positive somata with neatly stained cytoplasm and dendritic boutons (Figure 9f,h,i). Level L10 shows an important modification, with almost no Gαi2-positive immunolabeling along the entire perimeter of the VD epithelium (Figure 9j). However, at higher magnification, scattered Gαi2-immunopositive cells can be observed among Gαi2-immunonegative cells (Figure 9k).

Gαo immunolabeling (Figure 9l–q) was observed throughout the VD epithelium, starting at level L2 (Figure 9l). At central levels, L5 and L7, Gαo-immunolabeled NVN are observed, with no discrimination between lateral and medial epithelia (Figure 9m,o). Not all neuroreceptor cells of the epithelium are Gαo-positive, as immunopositive cells are interspersed among identifiable Gαo-negative regions (Figure 9n). At a more caudal level, L10, no Gαo immunostaining is observed in the VD epithelium, similar to the lack of Gαi2 immunolabeling at this level (Figure 9p). However, at higher magnification, a few Gαo-positive neuroreceptor cells can be observed in the lateral RE (Figure 9q).

Neuron-specific enolase (NE) is a neuron-specific maturity marker that produces a distinctive labeling pattern in both the NVN and SE, although NE distribution varies across VNO levels (Figure 10a–g). In the rostral VNO (level L3), mature neuroreceptor cells can be observed, interspersed throughout the dorsomedial SE (Figure 10a,d). At central levels L5 (Figure 10b) and L6 (Figure 10e), clear differentiation can be observed between the NE-immunopositive medial SE and the NE-immunonegative lateral RE. NE immunolabeling is present on the NVN and less intensely on the NCd. In the SE, neuronal somas of varying sizes and degrees of NE immunolabeling are spread over the entire basal layer (Figure 10c), with occasional neuronal somas appearing atypically proximal to the lumen (Figure 10h). At a more caudal level, L10, the density of NE immunolabeling in the SE decreases (Figure 10f), but at higher magnification (Figure 10g), a high density of NE-immunopositive neuroreceptor cells can be observed in the SE. An antibody against the OMP (Figure 10i–n) produces diffuse immunolabeling in the VD epithelium throughout the rostral (L2, L3) and central levels (L6) of the VNO (Figure 10k). At higher magnification, OMP immunolabeling appears more intense in individual neuroreceptor cells (Figure 10l–n). Anti-OMP does not immunolabel any cells in the caudal VD epithelium beyond level L10.

Protein gene product 9.5 (PGP 9.5) is a calcium-binding protein that can be used to characterize the neuroreceptor elements of the VNO (Figure 11a–e). At a central level (L7), anti-PGP 9.5 immunolabels the NVN and the SE (Figure 11a), including all neuroreceptor cells in the basal layer and their dendritic knobs (Figure 11b). At a more

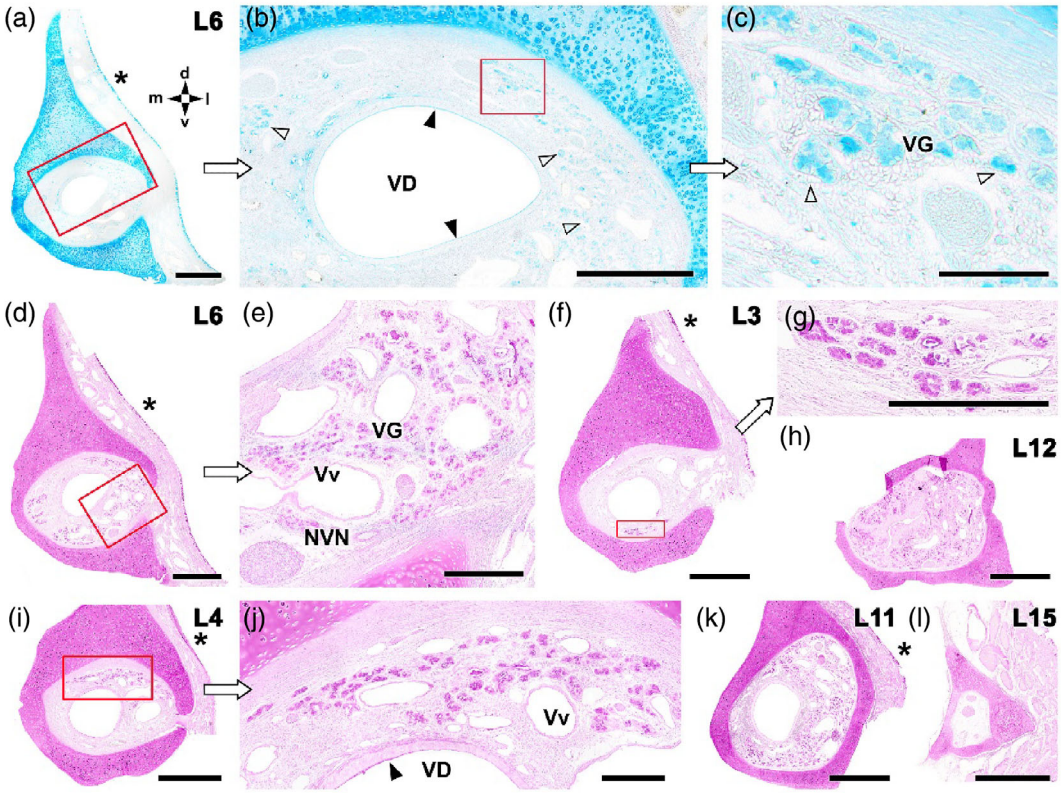

FIGURE 8 Glandular component of the gazelle dama vomeronasal organ (VNO). (a) Alcian Blue staining strongly marks the VC and the respiratory mucosal surface of the nasal cavity (asterisk). (b) At higher magnification of a section corresponding to the central L6 level, faint staining can be observed in a small group of glands located in the dorsal part of the parenchyma (open arrowheads) (c) At higher magnification of the box in (b), the serous nature of the VG can be observed. The luminal surface of the RE exhibits similar staining (arrowhead). (d) At the same level L6, PAS staining reveals significant glandular tissue development, encircling the entire VD. The VC and nasal cavity mucosa (asterisk) exhibit intense staining. (e) The enlarged inset in (d) displays the serous morphology of the VG. The veins basal lamina (Vv) and the connective tissue in the NVNs are slightly marked. (f) The more rostral levels exhibit a lower degree of VG development. At L3, the glands are located ventrally and possess a serous composition (g). (i) At level L4, VG are located dorsally, occupying most of the dorsal parenchyma (j). (h, k) At the most caudal levels of the VD (L12, L11, respectively), PAS-positive glandular development reaches its maximum expression. (l) The most caudal level of the VNO studied has no VGs. Directionality is indicated by the following: d, dorsal; l, lateral; m, medial; v, ventral. Scale bars: a, d, f, h, i, k, l = 500 μm; e, j = 150 μm; b, c, g = 100 μm.

caudal level, L11, the general immunolabeling pattern is similar to the pattern observed in the rostral VNO (Figure 11c); however, compared with the immunolabeling pattern observed in the central level L7, PGP 9.5–immunopositive cells in the caudal SE are not as uniformly arranged and sometimes aggregate in clusters (Figure 11d). In the RE, anti-PGP 9.5 only labels a few isolated cells (Figure 11e). Cytokeratin 8 (CYK8) is a general epithelial cell marker (Figure 11f–j). Anti-CYK8 produces a strong, almost homogeneous staining pattern in the SE and RE throughout the VNO, starting at the rostral levels L2 (Figure 11f) and L3 (Figure 11g). However, a few isolated cells are not CYK8-positive (Figure 11h,j).

Anti-calbindin (anti-CB, Figure 12a,b) stains the NVN and the SE. Most of the neuroreceptor cells in the basal SE are CB-immunopositive (Figure 12a), but many neuroreceptor cells in the apical layers remain unstained (Figure 12b). Anti-calretinin (anti-CR, Figure 12c–e) produces a similar immunolabeling pattern as anti-CB, with strong labeling of the NVN and the SE (Figure 12c,d), with only a few neuroreceptor cells remaining unstained (Figure 12e). Anti-secretagogin (anti-SG, Figure 12f,g,h,j,l) produces labeling in both the SE and RE, primarily in basal layers. In contrast to other marker antibodies, anti-SG does not label projections or dendritic boutons and produces a more diffuse pattern (Figure 12h,l). In the caudal level L10, anti-SG does not stain the VD epithelia (Figure 12j). Anti-parvalbumin (Figure 13i,k) diffusely labels the NVNs and vomeronasal epithelia throughout the VNO.

The results of the immunohistochemical study are schematically summarized in Figure 13.

3.2.3 | Lectin histochemical study

All of the lectins employed in the present study labeled the VGs and the muco-microvillar complex, which forms the superficial borders of both the SE and RE (Figure 14a–m). At levels L3 and L8, the lectin

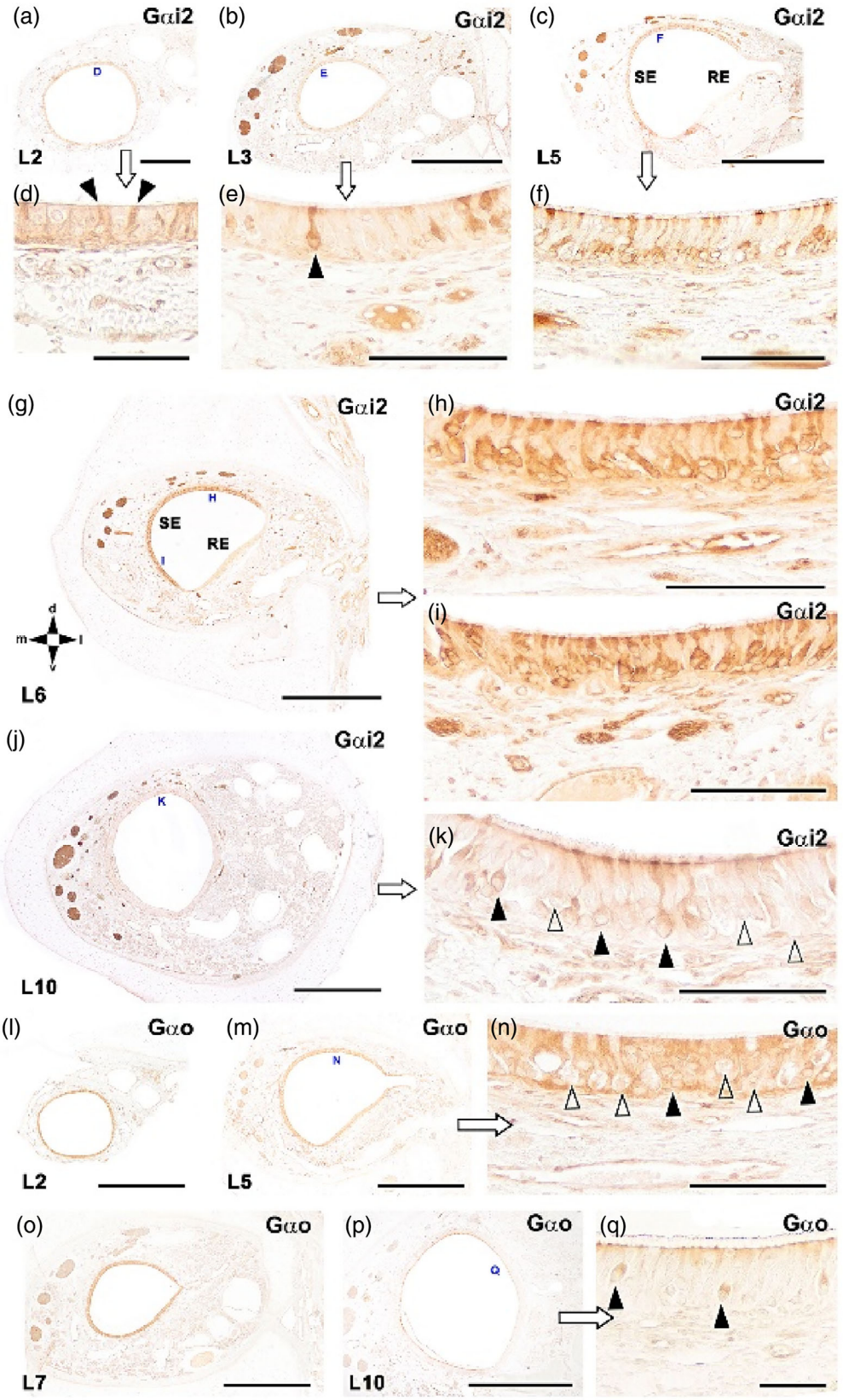

FIGURE 9 Legend on next page.

soybean agglutinin (SBA, *Glycine max*) strongly labeled the VG (Figure 14a,e). At a central level (L6), *Vicia villosa* agglutinin (VVA) faintly labeled the VG (Figure 14b). *Lycopersicon esculentum* agglutinin (LEA) labeled the vomeronasal epithelia, NVN, and VG but did not label the NCd (Figure 14c,d). At central levels (L4 and L5), *Solanum tuberosum* agglutinin (STA, Figure 14f,i) stained the vomeronasal epithelia, NVN, and VG (Figure 14k,n). *Ulex europaeus* agglutinin (UEA) stained both the vomeronasal epithelia and VG (Figure 14g,h,j,l,m) but did not stain NVN at any level (Figure 14g,j).

4 | DISCUSSION

Maintaining healthy and sustainable populations of endangered species, such as dama gazelle, contributes to the preservation of overall biodiversity and ecological balance within an ecosystem. Reintroductions of dama gazelles carried out in semi-freedom conditions, initially result in population growth, but their reproductive success begins to decline over time. The cause is unknown, but concern points to inbreeding depression or reproductive management issues in the reserves. The population is growing progressively in captivity, which will allow for the reinforcement of populations in their natural habitat in the future.

Chemical communications among individuals of the same species can play significant roles in reproductive behaviors. This communication can involve pheromones, which are chemical substances released by one individual that affect the behavior or physiology of another individual of the same species (Liberles, 2014). In many mammals, pheromones play crucial roles in mating behaviors, including mate attraction and selection. For example, female mice release pheromones that attract male mice and increase their sexual behaviors (Fu et al., 2015), and male hamsters release pheromones that stimulate female ovulation and receptivity (Richardson et al., 2004). Nowadays there is plenty of scope for the application of bovine pheromones (Landaeta-Hernández et al., 2023; Rekwot et al., 2001). However, before pheromones can be used to manage dama gazelle reproduction, the neuroanatomical and morphofunctional characterization of the dama gazelle VNO is necessary. The present study offers the first attempt, to our knowledge, to characterize the dama gazelle VNO. Across mammals, the VNS has been found to display wide morphofunctional diversity (Meisami & Bhatnagar, 1998; Smith et al., 2001; Smith, Garrett, et al., 2011; Wysocki, 1979), requiring the results of this study to be contextualized with regard to the interspecies variability observed in ruminants and in mammals, in general, which will provide further insights into the ecology, evolution, and conservation biology of dama gazelle.

Across all mammals, prior studies of the VNO have often been limited to the central part of the organ, ignoring changes along the rostrocaudal axis. However, numerous studies have evaluated spatial modifications in the VNO by performing serial macroscopic and histological sections, allowing for these anatomical and histological changes to be characterized (Bertmar, 1981; Kondoh et al., 2021; Ortiz-Leal et al., 2020; Salazar et al., 1995; Salazar, Lombardero, Alemañ, & Sánchez Quinteiro, 2003; Tomiyasu et al., 2022; Torres et al., 2020; Vedin et al., 2010). In the current study of the dama gazelle VNO, we extended this approach to include a spatial study of the immunohistochemical and lectin-histochemical features of the VD and NVN, allowing us to integrate morphological and functional observations along the entire length of the VNO.

4.1 | Macroscopic anatomy

The external morphology of the VNO is defined by the shape of its external capsule. In dama gazelle, the external capsule is cartilaginous, encompasses the entire VNO, and is topographically oriented such that the medial wall faces the vomer bone. These features are common to all ruminants in which the VNO has been studied. The shape of the dama gazelle VNO is relatively peculiar, as the VNO in most ruminants appears ovoid, with the major axis in the dorsoventral

FIGURE 9 Immunohistochemical study of G-proteins in the vomeronasal organ (VNO) of dama gazelle. (a) Immunolabeling of Gαi2 protein in the rostral VNO (level L2) faintly marks the entire VD epithelium. At higher magnification (d) it can be seen that this labeling is mainly due to the presence of scattered cells with neuroepithelial morphology and highly stained processes (arrowhead). (b) At the next level studied (L3), the vomeronasal duct, except for its lateral part, continues to show diffuse immunolabeling. This is in contrast to the strong immunolabeling present in the vomeronasal nerves, which remains consistent throughout the entire VNO. At higher magnification (e), the epithelium still shows scattered neuroreceptor cells. However, in comparison to the previous level, these cells possess larger and more intensely stained processes (arrowhead). (c) At the central level of the VNO (L5), the difference between the immunopositive sensory epithelium and the immunonegative lateral epithelium becomes evident for the first time. At higher magnification (f), the sensory epithelium exhibits its characteristic features: a continuous layer of neuroreceptor-positive somata with neatly stained cytoplasm and dendritic boutons. (g) At the L6 level, the vomeronasal duct acquires its crescent shape, and the difference between the SE and RE becomes more noticeable. (h, i) The entire length of the SE presents a similar microscopic structure. (j) The L10 level reflects a major modification, with minimal Gαi2-positive immunolabeling along the entire perimeter of the VD epithelium. (k) However, at higher magnification, scattered Gαi2-immunopositive cells can be observed among Gαi2-immunonegative cells (open arrowheads). (l) Immunolabeling with the anti-Gαo antibody was present throughout the VD epithelium, from the most rostral L2 level. (m, o) At levels L5 and L7, NVNs are immunolabeled, and there is no distinction between the lateral and medial epithelia. (n) At higher SE magnification at L5, it becomes apparent that not all neuroreceptor cells in the epithelium are Gαo-positive. There are distinct Gαo-negative regions (open arrowheads) interspersed between the immunopositive Gαo cells (black arrowheads). (p) At the L10 level, there is no immunostaining of the VD epithelium, as was the case with Gαi2. (q) However, higher magnification reveals the presence of Gαo-positive neuroreceptor cells, specifically in the lateral RE (arrowheads). Directionality is indicated by the following: d, dorsal; l, lateral; m, medial; v, ventral. Scale bars: c, g, j, l, m, o, p = 500 μm; a, b = 250 μm; e, f, h, i, k, n = 100 μm; q = 50 μm; d = 25 μm.

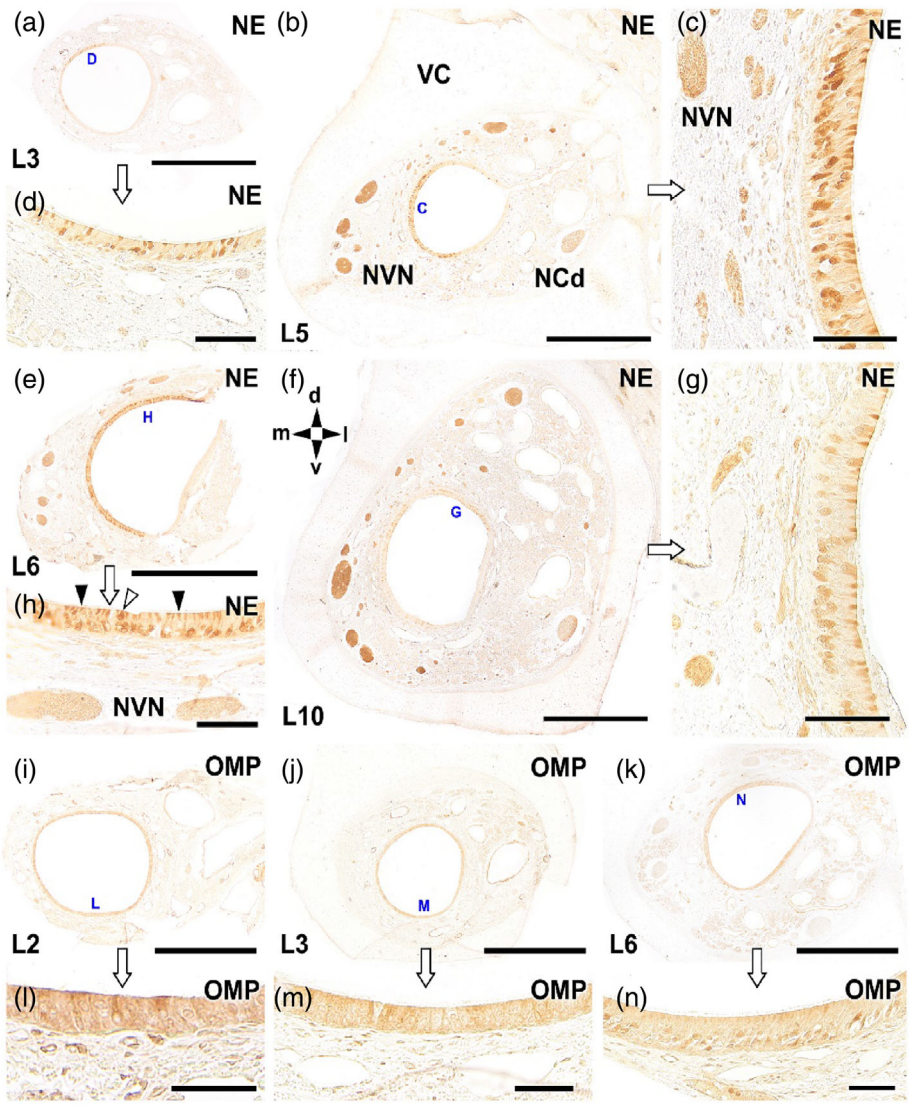

FIGURE 10 Analysis of neuronal maturity in the vomeronasal organ (VNO) of the dama gazelle. Neuron-specific enolase (NE) is a neuron-specific maturity marker, and it distinctively labels both the vomeronasal nerves (NVN) and the sensory epithelium (SE). However, its distribution varies depending on the level of study. (a) In the rostral part of the VNO (L3), mature neuroreceptor cells are interspersed throughout the dorsomedial SE. These neuroreceptor cells can be observed at higher magnification (d). (b) At central level L5, the immunopositive medial SE and the immunonegative lateral RE are clearly differentiated. Immunolabeling is present on both the NVNs and the NCd nerve, but the labeling is less intense in the latter. Higher magnification of the SE (c) reveals neuronal somas of varying sizes and degrees of immunolabeling that extend throughout the entire basal layer. (e) The next caudal level, L6, displays a comparable arrangement of the SE. At higher magnification (h), the apical zone of the SE contains the dendritic knobs of the receptor cells (black arrowheads) and individual neurons whose somas are atypically positioned next to the lumen (open arrowhead). (f) At a more caudal level, L10, the density of immunolabeling decreases in the SE. However, higher magnification of the SE (g) reveals a high density of NE-immunopositive neuroreceptor cells. (i–k) The OMP antibody produces diffuse immunolabeling in the VD epithelium at the rostral levels (L2, L3) (i, j) and central level (L6) (k). (l, m, n) At higher magnification, it is noticeable that immunolabeling is more intense in individual neuroreceptor cells. Directionality is indicated by the following: d, dorsal; l, lateral; m, medial; v, ventral. Scale bars: a, b, e, f, i–k = 500 μm; c, d, g, h, l–n = 100 μm.

orientation (Hart et al., 1988; Ibrahim et al., 2013; Jacobs et al., 1981; Park et al., 2014; Vedin et al., 2010), whereas the major axis of the ovoid dama gazelle VNO is lateromedial. However, notable variations in shape have been observed along the rostrocaudal axis of the organ in ruminant species, which have been examined using complete histological series, mainly cow (Salazar et al., 2008) and sheep, the latter more homogeneous in all its length (Salazar et al., 2007). Compared to these species, dama gazelle presents the largest degree of morphological variation. Another remarkable feature of the dama gazelle VNO is the presence of indentations in the lateral wall of the cartilage, which allows for the passage of vessels and nerves. Ruminants species present a wide lateral communication at rostral levels of the VNO. However, the central region of the cow VNO displays a wide lateral gap, which is lacking in the central region of the sheep

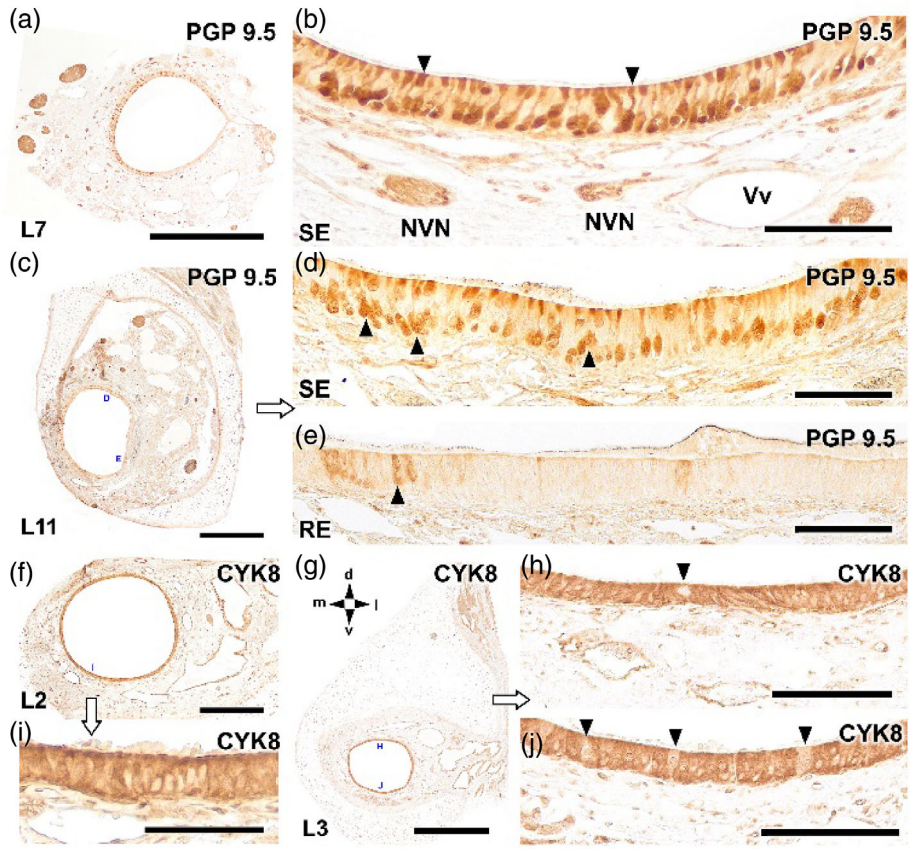

FIGURE 11 Characterization of the vomeronasal epithelium of the dama gazelle with anti-PGP 9.5 and CYK8. (a) Calcium-binding protein PGP 9.5 enables the characterization of the neuroreceptor elements in the sensory epithelium (SE). At the central level L7, anti-PGP 9.5 immunolabels the vomeronasal nerves (NVN) and SE. (b) Immunolabeling involves all neuroreceptor cells in the basal layer and their dendritic knobs (arrowheads). (c) At a more caudal level L11, the general immunolabeling pattern is similar to that observed in the rostral VNO. (d) At higher magnification, a significant number of PGP 9.5 immunopositive cells can be observed in the SE. However, compared to the previous level, these cells are not uniformly arranged. In fact, they are sometimes found in clusters (arrowheads). (e) In the RE, anti-PGP 9.5 only labels a few isolated cells (arrowhead). (f) Anti-cytokeratin 8 (CYK8) is a widely used marker for identifying epithelial cells. It provides a robust and almost homogenous staining pattern in the SE throughout the VNO, including its more rostral levels L2 (f) and L3 (g). (h–j) In the VD epithelium, there are a few isolated cells that are not CYK8-positive (arrowheads). Directionality is indicated by the following: d, dorsal; l, lateral; m, medial; v, ventral. Scale bars: a, c, g = 500 μm; f = 250 μm; b, d, e, h, j = 150 μm; i = 50 μm.

VNO (Salazar et al., 2007, 2008). The central region of the dama gazelle VNO displays a moderate lateral gap, which coincides with the formation of an internal recess that exclusively accommodates the main trunk of the NCd.

Data regarding how the VD communicates with the external environment is limited because the accurate determination of this communication requires the evaluation of a complete histological series using decalcified samples. Our observations in the dama gazelle VNO are consistent with available evidence in other ruminants, including both bovine (e.g., cow and sheep; Salazar et al., 2007, 2008), and non-bovine (e.g., moose) species (Vedin et al., 2010). In all cases, the VD opens into the ID and becomes incorporated on its medial side such that both ducts share the same cartilaginous capsule. In the dama gazelle VNO, we identified functional incisive papilla, which is not a feature common to all Antilopinae, as the three species of alcelaphine antelopes studied by Hart et al. (1988).

4.2 | Microscopic anatomy

4.2.1 | Vomeronasal epithelia

Our extensive serial histological study has allowed us to determine differences in the epithelial lining of the VD along the rostrocaudal VNO axis. The medial epithelium of the VD is home to the neuroreceptor cells responsible for semiochemical detection (Dennis et al., 2004; Mombaerts, 2004), whereas the lateral RE is home to the cells that produce the mucus required for chemoreception (Breipohl et al., 1979; Takami et al., 1995) and the growth factors that modulate neuroreceptors (Getchell et al., 2002).

The SE in the rostral junction between the VD and the ID is characterized as a squamous simple epithelium. Caudal to this junction, the SE transitions into a pseudostratified epithelium, comprising two cell layers consisting primarily of polyhedral cells with scattered receptor cells. At level L3, geometrical cells are replaced by elongated cells,

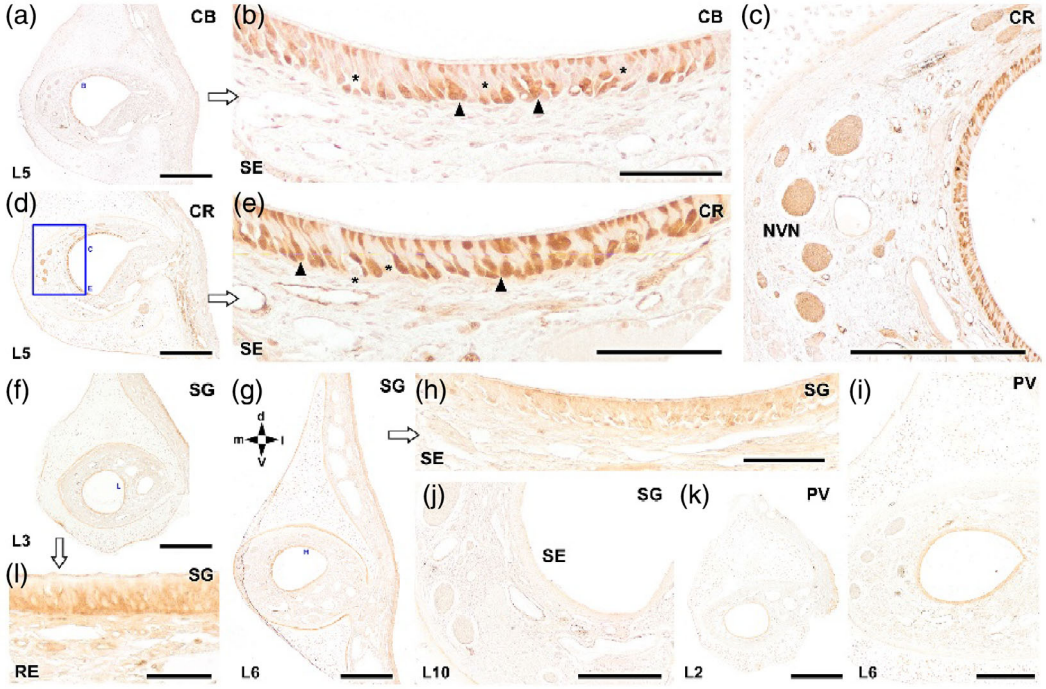

FIGURE 12 Characterization of the dama gazelle vomeronasal organ (VNO) by calcium-binding proteins. (a) Anti-calbindin (CB) stains the NVNs and the SE. (b) Most of the neuroreceptor cells in the basal SE are CB-immunopositive (arrowheads). However, many neuroreceptor cells in the apical layers remain unstained (asterisks). (c, d) Anti-calretinin (CR) produces a labeling pattern similar to that of CB, showing strong labeling of the NVNs and SE. (e) Only a few neuroreceptor cells remain unstained (asterisk). (f, g) Anti-secretagogin (SG) produces labeling in both vomeronasal epithelia, primarily among basal cells (h, l). In contrast to other markers, SG does not label projections or dendritic boutons, resulting in a more diffuse pattern. At the caudal level L10, anti-SG does not stain the VD epithelia. (i, k) Anti-parvalbumin (PV) diffusely marks the NVNs and vomeronasal epithelia throughout the VNO. Directionality is indicated by the following: d, dorsal; l, lateral; m, medial; v, ventral. Scale bars: a, d, e, f, g, k = 500 μm; c, i, j = 250 μm; b, e, h = 100 μm; l = 50 μm.

representing the transition to the typical vomeronasal receptor epithelium. At level L5, the medial epithelium begins to display the typical VNO morphology, characterized by a fully developed SE in a crescent-shaped lumen. At levels L7–L9, the VD displays a reduced diameter with a circular shape, and three-quarters of the epithelial lining contain neuroreceptors with a clear distinction observed between the basal neuroreceptor cells and the apical sustentacular cells, which have dense nuclei. This cellular organization is preserved throughout the caudal portion of the VD, although increases in the development of the parenchyma and the size of the VD are observed at L10 until the abrupt end of the VD at L12–L13. The squamous epithelium of the RE observed in the rostral levels is replaced by two layers of rounded or oval cells with scattered superficial cells featuring translucent nuclei until L4. At L5, a few polyhedral cells with translucent cytoplasm can be observed in the apical zone, but the features at this level are mostly typical for RE. This pattern can be observed throughout the caudal extremity of the VD, and even the earliest epithelial invaginations that give origin to the VD are lined exclusively with RE.

Remarkable changes in the lumen shape along the entire VNO length have not previously been described for other ruminants. In the cow, Adams (1986) describes the crescent shape as the predominant one, except for the anterior part of the organ. He describes a rostral VNO featuring a cuboidal stratified epithelium containing cells with lightly stained cytoplasm, which coincides with our observations for the rostral VNO of dama gazelle. Likewise, descriptions of the cow neuroepithelium, (Jang et al., 2021; Salazar et al., 2008; Taniguchi & Mikami, 1985) which contains basal, neuroreceptor, and sustentacular cells, and the organization of the cow RE coincide with our observations of these structures in dama gazelle. Similar observations have been made for other Bovinae, such as goat (Park et al., 2013), sheep (Ibrahim, 2018; Ibrahim et al., 2013; Kratzing, 1971; Salazar et al., 1998, 2000; Salazar et al., 2007; Salazar, Lombardero, Alemañ, & Sánchez Quinteiro, 2003), and water buffalo (Emam et al., 2016), in addition to other ruminants, such as giraffe (Kondoh, Nakamura, et al., 2017), reindeer (Bertmar, 1981), elk (Vedin et al., 2010), and Korean roe deer (Park et al., 2014). These data indicate that this organization represents a widely conserved evolutionary pattern in ruminants.

4.2.2 | The vascular pump

The vomeronasal pump is unique to mammals and is responsible for moving pheromone molecules from the external environment to sensory cells within the VNO, enhancing its chemosensory capabilities. The pumping mechanism is powered by vasomotor movements, which

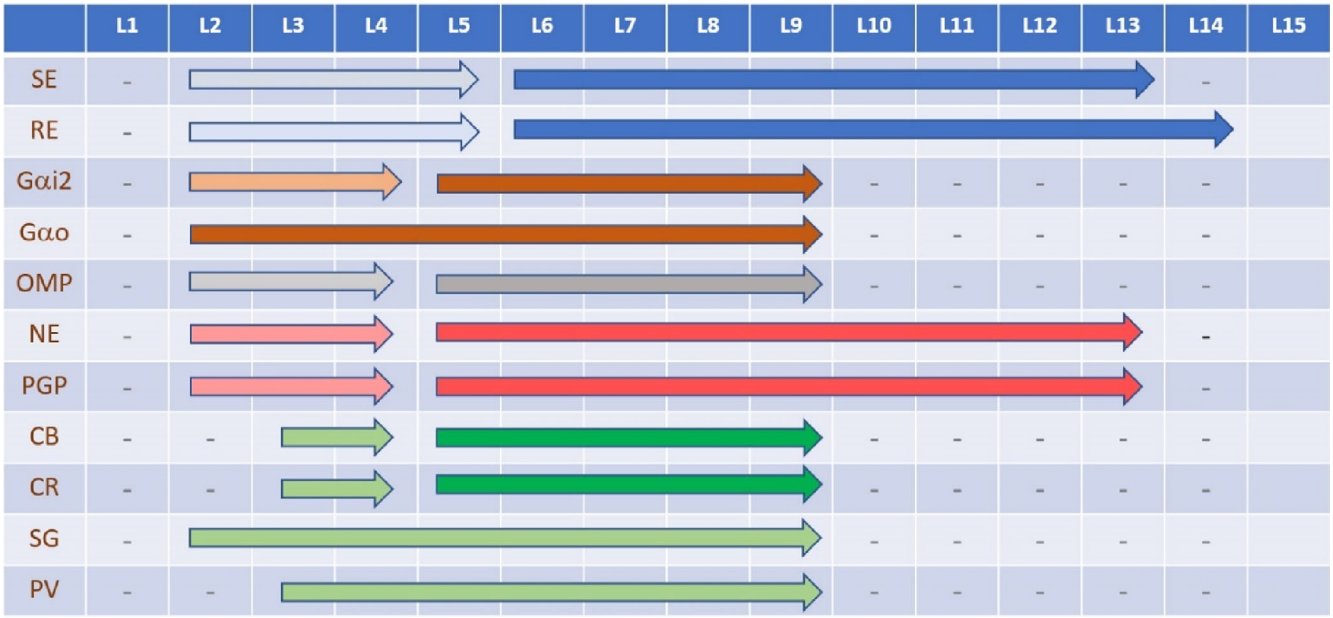

FIGURE 13 Schematic representation of neuromarker expression in the vomeronasal sensory epithelium along the rostrocaudal axis of the vomeronasal organ (VNO). The occurrence of sensory epithelium and respiratory epithelium along the VD is shown in blue. A fully differentiated epithelium is shown in dark blue, while light blue indicates an epithelium that has not yet adopted the typical characteristics of both sensory and respiratory epithelium. Brown indicates the expression of the two subunits of the G-proteins, Gαo and Gαi2 in the SE, with dark brown corresponding to full expression in the epithelium and light brown representing the diffuse presence of labeled neuroreceptor cells. Dark and light gray represent the OMP expression pattern. Calcium-binding proteins are represented in dark green in levels where the epithelium shows strong immunolabeling, and in light green where their expression is lower.

can suck stimuli into the VNO and actively expel the contents of the VD. These mechanisms are activated by fibers in the nasopalatine nerve, which cause the constriction of blood vessels within the VNO capsule (Meredith & O'Connell, 1979), reducing the blood volume in the cavernous tissue and creating a pressure differential that expands the VNO lumen and draws in fluid from the region around the duct opening (Meredith et al., 1980). Stimuli enter the VNO via the mucus stream flowing past the VD from the ID. Effective vomeronasal stimuli are mucus-soluble chemicals or substances that become mucus-soluble when bound to carrier molecules, such as those secreted by VGs (Krishna et al., 1995).

The development of the vascular component in the dama gazelle VNO is observable starting at the rostral levels, where the lateral parenchyma is completely occupied by blood vessels. Moving caudally, the vessels extend toward the dorsal and ventral areas and, finally, in the caudal sections, occupy the entire parenchyma, which we observed in both transverse and horizontal sections. This pattern of vascular development is common among those ruminant species in which the vascular component has been studied (Salazar et al., 1998, 2008; Vedin et al., 2010). In dama gazelle, we observed that the vomeronasal neuroepithelium extends nearly to the caudal interdigitations of the VD, which arise directly from VGs in that region, a feature that we are not aware of being described in other species. Therefore, the presence of a more developed vasculature in the caudal extremity of the VNO is hypothesized to contribute to the generation of strong negative pressure, which would be necessary for external stimuli to reach the receptors located in the caudal VNO. The ability of stimuli to reach caudal receptors would depend both on the vascular pup activity and on the physicochemical properties of stimulus molecules. A gradient of dispersion is likely established along the length of the duct, such that only those substances that are highly soluble in glandular secretions reach the caudal extremity, whereas less soluble substances remain in the rostral regions. Consistent with this concept, we hypothesize that the specificity of vomeronasal receptors along the VD is adapted to accommodate the differential migration of substances along the duct, similar to how compounds are eluted along a chromatography column.

4.2.3 | Vomeronasal glands

The vomeronasal epithelia in the VNO are coated with a mucous fluid produced by VGs, which is necessary to carry external stimuli to the neuroepithelium (Sankarganesh et al., 2022). This mucous fluid contains various enzymes able to transform the structures of molecules, which can determine the ability of these molecules to activate neuroreceptors, influencing olfactory (Nagashima & Touhara, 2010). The mucous fluid also contains enzymes with antibacterial and antioxidative properties (Ding & Xie, 2015).

Mucous fluid properties differ across mammal species (Kondoh et al., 2020) and are often characterized using AB, which stains the acidic polysaccharides synthesized and secreted by VGs, and PAS, which stains neutral polysaccharides. Initial studies examining VGs concluded that they only secreted neutral compounds in all species

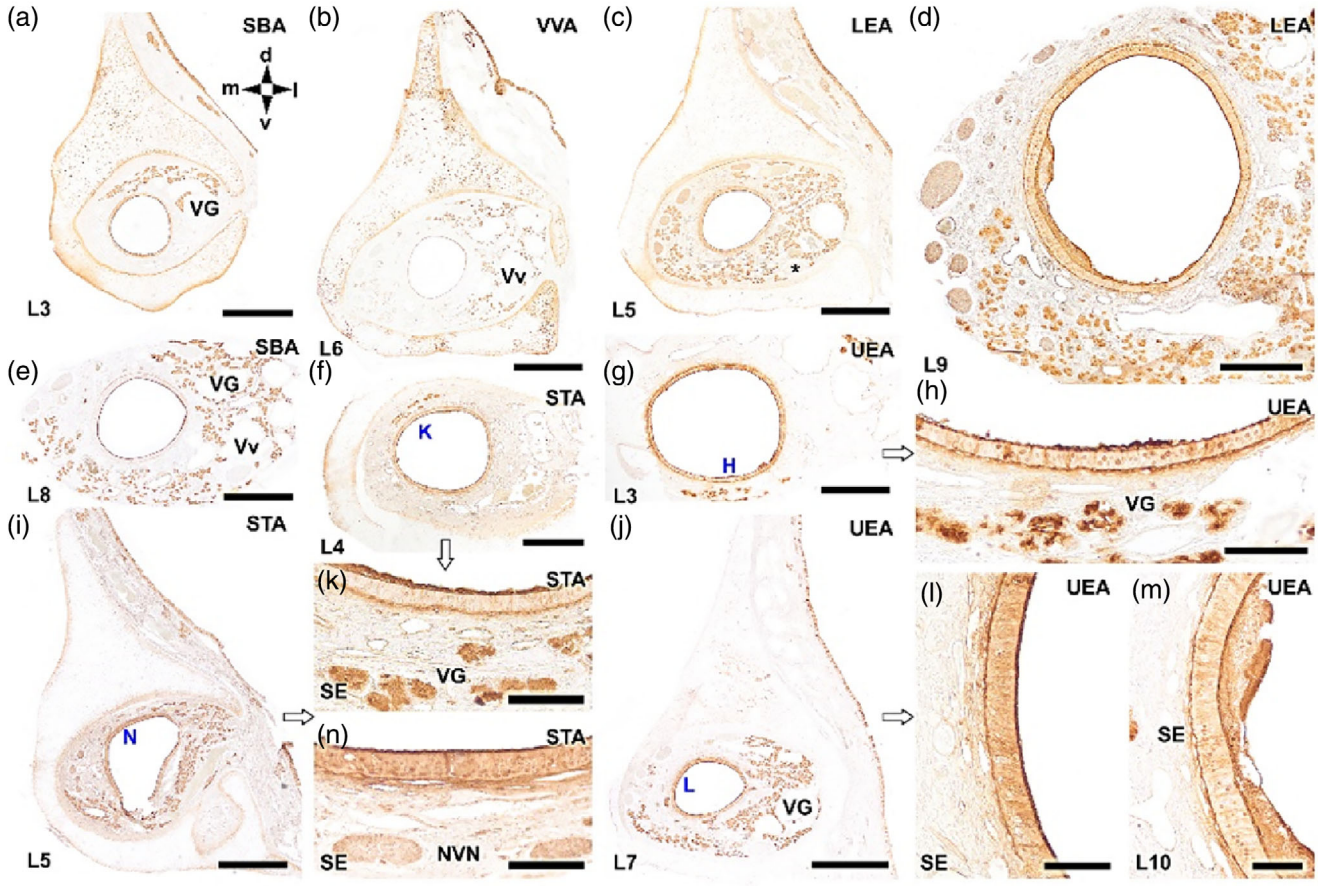

FIGURE 14 Lectin-histochemical study of the dama gazelle vomeronasal organ (VNO). All of the lectins employed labeled the vomeronasal glands (VGs) and the muco-microvillar complex, that is, the superficial border of both vomeronasal epithelia. (a, e) Labeling of the VNO at levels L3 and L8 using the lectin SBA (*Glycine max*). In both cases, the VG are labeled strongly. (b) VVA (*Vicia villosa*) labeling at the central level L6 of the VNO reveals a faint labeling of the VG. (c, d) LEA (*Lycopersicon esculentum*) labels the vomeronasal epithelia, the NVNs, and the VG. However, LEA does not stain the NCd (asterisk in c). (f, i, k, n) STA (*Solanum tuberosum*) lectin labeling at the central levels (L4, L5) of the VNO stains the vomeronasal epithelia, vomeronasal nerves (NVN), and VG. (g, h, j, l, m) UEA (*Ulex europaeus*) lectin stains vomeronasal epithelia, VG, but hardly stains NVNs. Vv, veins; directionality is indicated by the following: d, dorsal; l, lateral; m, medial; v, ventral. Scale bars: a–c, e, i, j = 500 μm; d, f, g = 250 μm; h = 100 μm; k–n = 50 μm.

examined due to the ability of PAS but not AB to stain glandular tissue (Cuschieri & Bannister, 1974; Loo & Kanagasunteram, 1972; Oikawa et al., 1993, 1994; Salazar et al., 1996). Their results reflected the positivity of the glandular tissue to the PAS marker, while AB produced a negative result. However, in 1997, Salazar and collaborators showed AB-positive VGs for the first time in the VNO of cow and horse, which also featured PAS-positive glands (Salazar, Quinteiro, & Cifuentes, 1997). Subsequently, several authors obtained similar results, detecting both types of VGs, in all ruminants studied, including cow (Jang et al., 2021; Salazar et al., 2008), sheep (Salazar et al., 2000, 2007), goat (Yang et al., 2021), sika deer (Kondoh et al., 2020), giraffe (Kondoh, Nakamura, et al., 2017), and goitered gazelle (Abood & Hussein, 2018). The degree of glandular development and the intensity of the response to both PAS and AB were similar for all studied species.

Our observations in dama gazelle reveal a clear distinction between these two types of VGs. PAS produced a generalized staining of the glandular component, from the rostral level L3 to the caudal end of the VNO, whereas AB only stained the central part of the VNO (level L6), restricted to a small group of VGs in the dorsal parenchyma. This result highlights the importance of examining the entire VNO when making comparisons across animals, as extrapolations may not be possible using information obtained from limited areas. For example, AB-positive VGs were recently identified in musk shrews (Kondoh et al., 2020), despite no evidence of AB-positive VGs in this species during initial studies (Oikawa et al., 1993).

4.2.4 | Innervation

The distribution of the two main VNO innervation components, unmyelinated NVN fibers and myelinated NCd fibers, have not been well studied in ruminants. However, our observations in dama gazelle are comparable to those described in other bovine species (Salazar

et al., 2007; Salazar, Quinteiro, & Cifuentes, 1997; Vedin et al., 2010). Our serial histological study revealed that starting in the most rostral levels (L3), sensory innervation can be observed in the medial parenchyma, indicating significant sensory innervation for the rostral neuroepithelium, even though the rostral levels lack the layered structure or receptor density characteristic of the central levels.

4.3 | Immunohistochemical study

Given the remarkable variations observed in the structure of the VD and its epithelial lining, we conducted an immunohistochemical assessment of VNO markers along the entire length of the VNO rather than limiting this analysis to the central VNO.

We used specific antibodies against the α subunits of the Gi2 and Go proteins to characterize the expression of the vomeronasal receptors, V1R and V2R, respectively (Dulac & Axel, 1995; Ryba & Tirindelli, 1997). An investigation of G protein expression and distribution in the goat VNS revealed, for the first time, that the Go pathway was absent in some species (Takigami, 2000), a finding that was subsequently confirmed in numerous mammals, including Laurasiatheria and Primates (Suárez et al., 2011). However, discrepancies between gene sequencing and immunohistochemical studies have been documented, particularly in the order Carnivora. Dennis et al. (2003), studying the dog, and Ortiz-Leal et al. (2020), studying the fox, both observed immunopositive labeling in the vomeronasal SE using both anti-Gαi2 and anti-Gαo antibodies, despite the apparent absence of functional V2R genes in the genomes of both species (Kukekova et al., 2018; Young & Trask, 2007). However, new sequencing studies focused on olfactory and vomeronasal genes are likely to result in the addition of new genes to the vomeronasal repertoire, which was initially defined using a whole-genome approach. Recently Kondoh et al. (2022) detected using genome assembly the presence of functional V2R genes in the genomes of cattle, goats, sheep, and pigs, which previously were thought to be absent from these species.

The study by Kondoh et al. (2022) was limited to the expression of Gαi2 and Gαo in the AOB, the first integrative center for the VNS in the brain, without performing immunohistochemistry in the VNO itself. Our study in dama gazelle examined both Gαi2 and Gαo immunopositivity in the VNO and throughout the vomeronasal epithelium. By performing a serial immunohistochemical study along the entire VD, we were able to confirm a lack of consistent expression for both markers in the whole SE, as a significant portion of the VD did not express either protein. In particular, the large segment extending from L9 to L13, despite having a well-characterized neuroepithelium, lacked any immunolabeling for either protein, indicating that the receptors expressed in this caudal third of the VD are likely not either V1R or V2R and suggesting that the molecules detected by V1R and V2R do not reach the caudal end of the VD. We hypothesize that only low-molecular weight compounds that are highly soluble in the vomeronasal mucus can be detected in the caudal VD, likely by receptors that have not yet been described. The absence of vomeronasal receptor expression in such a large stretch of the VNO could explain why previous studies of G-protein expression in the ruminant VNO, including goat (Takigami, 2000), sheep (Salazar et al., 2007), and sika deer (Matsubara et al., 2019), have failed to detect Gαo immunopositivity, as these studies are typically performed in a single, either central or caudal level, where these proteins were not detected in dama gazelle.

Kondoh et al. (2022), in their study of the cow AOB, did not detect Gαo immunopositivity, and Gαo was also not detected in the dog (Salazar et al., 2013) or fox AOB (Ortiz-Leal et al., 2022); however, the lack of Gαo expression in the AOB does not preclude V2R expression in the VNO, as information from these receptors may project to areas of the olfactory bulb other than the AOB. In the fox olfactory bulb, Gαo expression in the NVN was found to project not to the AOB but to the olfactory limbus, a transition zone between the main olfactory bulb and the AOB (Ortiz-Leal et al., 2023).

While the presence of functional V2R genes in artiodactyls aligns with our detection of Gαo-immunoreactivity in the dama gazelle VNO, we must acknowledge the possibility of Gαo protein serving a different role in the VNO. For instance, it could potentially be involved in cell-to-cell communication in other parts of the nervous system, as described by Jiang and Bajpayee (2009), which may not be directly related to transduction. Nonetheless, this observation would mark the first piece of evidence for this particular function in the vomeronasal neuroepithelium of any mammal, and it does not align with the immunolabeling pattern we observed in the dama gazelle VNO. The immunolabeling pattern spans dendritic processes, the cell body (soma), and the axons that make up the NVN, consistent with typical patterns seen in species where both G-proteins are involved in the transduction cascade (Halpern & Martinez-Marcos, 2003).

The neuronal maturity of the VNO neuroepithelium in dama gazelle was analyzed using anti-OMP, a widely used molecular marker for olfactory neurons in both the olfactory mucosa and the VNO in various species (Rodewald et al., 2016; Sasuga et al., 2013; Smith, Dennis, et al., 2011). The functional properties of OMP remain under debate, but it has been shown to play roles in neuronal maturation and stimulus–response selectivity (Buiakova et al., 1996). In dama gazelle, OMP-positive immunolabeling could be observed in the rostral vomeronasal SE, but no OMP staining was observed in the caudal levels L10–L13, similar to the pattern observed for G protein labeling. Anti-OMP stained cell bodies more intensely than dendrites, a pattern that was also observed in sheep (Ibrahim, 2018), cow (Jang et al., 2021), and roe deer (Shin et al., 2017). However, OMP staining in the goat showed the reverse pattern, with dendrites staining more intensely than cell bodies (Park et al., 2013; Yang et al., 2021). Reported anti-OMP immunolabeling patterns in the RE vary across ruminants. No OMP-positive immunolabeling was detected in the sheep RE (Salazar et al., 2007), whereas the roe deer features OMP-positive ciliated and basal cells (Shin et al., 2017). By contrast, dama gazelle show an intermediate pattern, with diffuse labeling and only a few ciliated OMP-positive cells in the RE, and a similar intermediate pattern has been reported in both cow and Korean black goat (Park et al., 2013; Yang et al., 2021).

To better understand the neurochemical properties of the vomeronasal neuroepithelium, we used several neuronal markers. PGP 9.5 is

a neuronal biomarker expressed in sensory paraneurons that plays a vital role in ubiquitin regulation. PGP 9.5 is expressed in olfactory receptor cells, taste bud cells, and vestibular hair cells (Iwanaga et al., 1992; Johnson et al., 1994). Our PGP 9.5 labeling in dama gazelle is consistent with labeling observed in sheep (Ibrahim, 2018), cows (Jang et al., 2021), Asian roe deer (Park et al., 2014) and Korean black goats (Park et al., 2013). PGP 9.5–positive cells show strong immunoreactivity in their soma, dendrites, and axons, which extend through the lamina. Additionally, some PGP 9.5–positive ciliated cells were observed in the RE, as reported in all studied ruminants except sheep.

Our investigation along the rostrocaudal axis of the VNO revealed PGP 9.5 expression in the caudal SE (L10–L13), a region lacking G proteins and OMP expression. The presence of PGP 9.5 immunolabeling confirms the neuroepithelial nature of this epithelial tissue, as indicated by histological results, and suggests that this region expresses receptors other than those in the V1R and V2R families.

NE, a brain-specific isozyme of the glycolytic enolase enzyme, is consistently found in the cytoplasm of mature neurons, including sensory neurons (Iwanaga et al., 1989). To our knowledge, no prior immunohistochemical studies examining NE have been performed in ruminants. Our observations in dama gazelle are consistent with the prior immunolabeling pattern reported for a wide variety of mammals, including rodents and humans (Takami et al., 1993; Wang et al., 1994), and extend our understanding of NE positivity throughout the entire SE, confirming the neurosensory nature of the caudal third of the VD indicated by PGP 9.5 staining.

Calcium-binding proteins modulate calcium signaling and the transmission of sensory information and serve as specific markers of vomeronasal receptor cells. Although their presence has been identified in the VNO of a wide range of mammals groups, including Rodentia (Jia & Halpern, 2003; Kishimoto et al., 1993; Torres et al., 2020), Marsupialia (Jia & Halpern, 2004; Torres et al., 2022), Canidae (Ortiz-Leal et al., 2020), Soricidae (Malz et al., 2000), and Hominidae (Johnson et al., 1994), no available information exists regarding calcium-binding proteins in the VNO of ruminants. By studying four calcium-binding proteins, CB, CR, SG, and parvalbumin, we were able to fill an important gap in the study of VNO neurochemistry for a large group of mammals. In addition, our study represents the first description of SG in the mammalian VNO (Wagner et al., 2000). Of the four markers we studied, CB and CR provided the best characterization of the structural elements that form the neuroreceptor epithelium of the VNO, as SG and parvalbumin were detected in both the SE and RE. In dama gazelle, anti-parvalbumin staining was similar to the pattern observed in the mouse VNO, which was moderate but less intense than CB or CR staining (Kishimoto et al., 1993).

Antibodies against both CB and CR stained a subpopulation of vomeronasal receptor neurons in the dama gazelle VD. The somata of the immunoreactive neurons were located in the basal and middle regions of the VNO SE, in contrast with the apical position of CB-positive somata in the rat VNO (Jia & Halpern, 2003). Thick apical dendrites, piriform somata, and axons were clearly stained by both markers in the dama gazelle VNO. In addition, CB- and CR-immunoreactive axons were observed in the nerve bundles in the lamina propria and in the NVN, a pattern that gradually appeared in the SE at rostral levels L3–L4 before appearing throughout the SE from levels L5 to L9. Similar to G-protein and OMP expression, calcium-binding protein expression was not detected in the caudal SE.

The immunohistochemical study also included the specific characterization of epithelial tissue by examining the expression of CYK8, a type II intermediate filament protein (Franke et al., 1981). In dama gazelle, anti-CYK8 broadly identified neuroreceptor cells and sustentacular cells across the SE and RE. However, anti-CYK8 did not produce homogeneous labeling in the anterior VNO, with no staining observed in the apical polygonal cells, whose functional significance remains unknown. We did not find any references to this cell type in the VNO literature. Most cytokeratin investigations in the VNO have used cytokeratin cocktails. In dogs, Dennis et al. (2003) found that cytokeratin immunolabeling was restricted to basal cells, whereas in opossum, Poran (1998) found a more diffuse pattern, similar to the pattern observed in dama gazelle but with greater intensity detected in the RE than in the SE.

4.4 | Lectin histochemical study

Lectins are a type of agglutinin capable of binding to certain glycoconjugates found on the cell surface (Brooks, 2023). The luminal surface of the VD is covered by a layer of glycocalyx, comprised of carbohydrates and proteins, allowing lectins to be particularly useful for investigations of the VNS (Plendl & Sinowatz, 1998). Lectins are often used to identify sensory cells, the RE, and glandular components of the VNO (Halpern et al., 1998). If we limit our focus to the nervous tissue, it is remarkable how certain lectins are unique to the vomeronasal pathway. Certain lectins are unique to the neuronal tissues found in the vomeronasal pathway, able to recognize the dendrites, somas, axons, and terminal projections of neuronal cells (Chun et al., 2023; Kondoh et al., 2018; Kondoh, Kamikawa, et al., 2017; Salazar et al., 1994). However, studies of the VNS using lectins must recognize that labeling patterns are highly specific, with notable differences even between species as phylogenetically close as the rat (Salazar & Sánchez Quinteiro, 1998) and the mouse (Salazar et al., 2001). Therefore, cross-species extrapolations should be avoided.

In our investigation of the dama gazelle VNO, we examined five lectins to reveal the glycoconjugate-binding patterns in the SE, RE, NVN, and VGs. All of the lectins used stained VGs and the muco-microvillar complex, which covers the luminal surface of both the SE and RE. In addition, each lectin stained specific structures of the VNO and exhibited individual localization patterns and labeling intensities. SBA produced intense labeling of the glandular tissue throughout the VNO, starting in the rostral extremity. Similarly, VVA stained the VGs in the central VNO but with a much lower intensity than SBA. Neither SBA nor VVA stained the VD epithelia or NVN axons. LEA and STA strongly labeled the vomeronasal epithelium, VGs, and NVN but did not label the NCd. UEA labeling was concentrated in the vomeronasal epithelium and VGs, with no staining observed in the parenchymal

NVN. In contrast to the proteins detected in the immunohistochemical study, no noticeable differences were observed in the lectin-histochemical labeling patterns along the rostrocaudal axis of the VNO.

These labeling patterns obtained using these lectins in dama gazelle have both similarities and differences compared with the labeling patterns obtained using these lectins in the VNO of other ruminant species, including sheep (*Ovis orientalis aries*) (Ibrahim et al., 2013; Salazar et al., 2000, 2007), cow (*Bos taurus coreanae*) (Jang et al., 2021), goat (*Capra aegagrus hircus*) (Park et al., 2013; Yang et al., 2021), and Asian roe deer (*Capreolus pygargus*) (Park et al., 2014; Shin et al., 2017).

In dama gazelle, SBA produced labeling similar to that observed in sheep (Ibrahim, 2018) with staining observed only in VGs and the luminal rim of the vomeronasal epithelium. SBA produced moderate staining in the vomeronasal SE of other ruminant species, such as cow (Jang et al., 2021), goat (Park et al., 2013; Yang et al., 2021), and roe deer (Park et al., 2014). In cow, SBA also moderately stains the NVN (Jang et al., 2021).

In dama gazelle, VVA only labeled the superficial border of the epithelium and VGs, although less intensely than SBA. By contrast, in cow (Jang et al., 2021), and to a lesser extent, in the sheep (Ibrahim et al., 2013) VVA moderately stains the vomeronasal epithelium and NVN.

LEA stained numerous vomeronasal structures in dama gazelle, including the vomeronasal epithelial rim, vomeronasal epithelium, VGs, and NVN. In cow, sheep, and roe deer, LEA stains the same structures in a similar fashion (Ibrahim et al., 2013; Jang et al., 2021; Salazar et al., 2000; Shin et al., 2017). Interestingly, STA staining produces the same pattern as LEA staining, labeling the luminal rim, vomeronasal epithelium, VGs, and NVN in dama gazelle, roe deer, and cow (Jang et al., 2021; Shin et al., 2017). Finally, the UEA lectin marked three vomeronasal structures in the VNO of the dama gazelle: the luminal rim, the vomeronasal epithelium, and the VGs. UEA labeled three vomeronasal structures in the dama gazelle VNO: the luminal rim, the vomeronasal epithelium, and VGs. This pattern was also observed in sheep, goat, roe deer, and cow, although faintly (Ibrahim et al., 2013; Jang et al., 2021; Park et al., 2013; Salazar et al., 2000; Shin et al., 2017). In cow, UEA also stains the NVN (Jang et al., 2021).

In summary, our study has contributed to filling an existing gap in knowledge regarding the structure of the VNO in wild ruminant species, as little information on the histological and neurochemical organization of the ruminant VNS is currently available. By investigating the dama gazelle VNO, we have gained valuable insights into the structure and function of this critical sensory structure in this endangered species. Because dama gazelle is a threatened species, the information obtained from our study can be used to design and implement programs utilizing pheromones to enhance breeding success and increase genetic diversity in captive populations, which may be critical for the survival of the species. Our work provides a solid morphological foundation for future research on this topic.

Finally, our study also significantly contributes to the general study of the VNO. By conducting a comprehensive histological and immunohistochemical study of the organ, we identified notable differences in the organization of the VD and the expression of various neuronal markers along the rostrocaudal VNO axis. These findings highlight the importance of considering such differences when conducting future studies of the VNO in other species. Overall, our study underscores the critical roles played by the VNO in mediating social and reproductive behaviors in dama gazelle and highlights the need for further research to better understand this unique sensory structure in other wild ruminant species.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Mateo V. Torres: Conceptualization; investigation; writing – original draft; methodology; writing – review and editing; formal analysis. **Irene Ortiz-Leal:** Conceptualization; investigation; writing – original draft; methodology; writing – review and editing; formal analysis. **Andrea Ferreiro:** Investigation; methodology; data curation. **José Luis Rois:** Data curation; methodology; investigation. **Pablo Sanchez-Quinteiro:** Conceptualization; investigation; funding acquisition; writing – original draft; methodology; writing – review and editing; formal analysis; project administration; data curation; supervision; resources.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank MARCELLE NATUREZA park (Outeiro de Rei, Spain) for providing the animal employed in this study. The authors would like to express their gratitude to Dr. Ludwig Wagner (University of Vienna) for kindly donating the antibody against secretagogin.

FUNDING INFORMATION

This work was partially supported by a grant from "Consello Social Universidade de Santiago de Compostela" 2022-PU004.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ETHICS STATEMENT

All the animals employed in this study dead by natural causes.

ORCID

Mateo V. Torres https://orcid.org/0000-0002-7671-3379
Irene Ortiz-Leal https://orcid.org/0000-0002-8468-3659
Pablo Sanchez-Quinteiro https://orcid.org/0000-0002-9891-4817

REFERENCES

Abáigar, T., Rodríguez-Caballero, E., Martínez, C., Amaouch, Z., Samlali, M. L., Aparicio, F., El Balla, T., Essalhi, A., Fernández, J., García, F., Haya, M., M'Bareck, A., M'Bareck, H., González, L. M., & Fernández de Larrínoa, P. (2019). The first reintroduction project for mhorr gazelle (*Nanger dama mhorr*) into the wild: Knowledge and experience gained to support future conservation actions. *Global Ecology and Conservation*, *19*, e00680. https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00680

Abood, D. A., & Hussein, Z. M. (2018). Histological and histochemical features for Jacobson's Glands in male *Gazella subgutturosa*. *Indian Journal of Natural Sciences*, *8*(46), 13107–13114.

Adams, D. R. (1986). The bovine vomeronasal organ. *Archivum Histologicum Japonicum*, *49*(2), 211–225. https://doi.org/10.1679/aohc.49.211

Adrio, F., Rodríguez-Moldes, I., & Anadón, R. (2011). Distribution of glycine immunoreactivity in the brain of the Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*): Comparison with γ-aminobutyric acid. *The Journal of Comparative Neurology*, *519*(6), 1115–1142. https://doi.org/10.1002/cne.22556

Alados, C., Escos, J., & Vericad, J. R. (1988). Captive populations of northwest African Antilopinae and Caprinae at the Estación experimental de Zonas Áridas. In A. Dixon & D. Jones (Eds.), *Conservation and biology of desert antelopes* (pp. 199–211). Christopher Helm Ltd.

Alpár, A., Attems, J., Mulder, J., Hökfelt, T., & Harkany, T. (2012). The renaissance of Ca^{2+}–binding proteins in the nervous system: Secretagogin takes center stage. *Cellular Signalling*, *24*(2), 378–387. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.09.028

Archer, C., Garcia, A., Henderson, M., & McGlone, J. J. (2022). Olfactory enrichment using a maternal pheromone improved post-weaning pig performance and behavior. *Frontiers in Veterinary Science*, *9*, 965370. https://doi.org/10.3389/fvets.2022.965370

Archunan, G., Rajanarayanan, S., & Karthikeyan, K. (2014). Cattle pheromones. In E. C. Mucignat-Caretta (Ed.), *Neurobiology of chemical communication*. CRC Press/Taylor & Francis. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK200988/

Arregui, L., Garde, J. J., Soler, A. J., Espeso, G., & Roldan, E. R. S. (2021). Effect of season and social environment on semen quality and endocrine profiles of three endangered ungulates (*Gazella cuvieri*, *G. dorcas* and *Nanger dama*). *Animals*, *11*(3), 901. https://doi.org/10.3390/ani11030901

Barrios, A. W., Sanchez Quinteiro, P., & Salazar, I. (2014). THE nasal cavity of THE sheep and its olfactory sensory epithelium: NASAL CAVITY OF THE SHEEP. *Microscopy Research and Technique*, *77*(12), 1052–1059. https://doi.org/10.1002/jemt.22436

Bertmar, G. (1981). Variations in size and structure of vomeronasal organs in reindeer Rangifer tarandus tarandus l. *Archives de Biologie*, *92*(3), 343–366.

Breipohl, W., Bhatnagar, K. P., & Mendoza, A. (1979). Fine structure of the receptor-free epithelium in the vomeronasal organ of the rat. *Cell and Tissue Research*, *200*(3), 383-395. https://doi.org/10.1007/BF00234850

Bronson, F. H. (2009). Climate change and seasonal reproduction in mammals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *364*(1534), 3331–3340. https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0140

Brooks, S. A. (2023). Lectin Histochemistry: Historical perspectives, state of the art, and future directions. In E. C. Pellicciari, M. Biggiogera, & M. Malatesta (Eds.), *Histochemistry of single molecules* (Vol. 2566, pp. 65–84). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2675-7_6

Buiakova, O. I., Baker, H., Scott, J. W., Farbman, A., Kream, R., Grillo, M., Franzen, L., Richman, M., Davis, L. M., Abbondanzo, S., Stewart, C. L., & Margolis, F. L. (1996). Olfactory marker protein (OMP) gene deletion causes altered physiological activity of olfactory sensory neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences the United States of America*, *93*(18), 9858–9863. https://doi.org/10.1073/pnas.93.18.9858

Cassinello, J., & Pieters, I. (2000). Multi-male captive groups of endangered dama gazelle: Social rank, aggression, and enclosure effects. *Zoo Biology*, *19*(2), 121–129. https://doi.org/10.1002/1098-2361(2000)19:2<121::AID-ZOO3>3.0.CO;2-1

Chun, J., Kang, T., Seo, J.-P., Jeong, H., Kim, M., Kim, B. S., Ahn, M., Kim, J., & Shin, T. (2023). Glycoconjugate-specific developmental changes in the horse vomeronasal organ. *Cells, Tissues, Organs*. https://doi.org/10.1159/000528883

Clifford, A. B., & Witmer, L. M. (2004). Case studies in novel narial anatomy: 3. Structure and function of the nasal cavity of saiga (Artiodactyla: Bovidae: *Saiga tatarica*). *Journal of Zoology*, *264*(3), 217–230. https://doi.org/10.1017/S0952836904005540

Cloudsley-Thompson, J. L. (1992). Wildlife massacres in Sudan. *Oryx*, *26*(4), 202–204. https://doi.org/10.1017/S0030605300023723

Coppola, J. J., & Disney, A. A. (2018). Most calbindin-immunoreactive neurons, but few calretinin-immunoreactive neurons, express the m1 acetylcholine receptor in the middle temporal visual area of the macaque monkey. *Brain and Behavior*, *8*(9), e01071. https://doi.org/10.1002/brb3.1071

Cuschieri, A., & Bannister, L. H. (1974). Some histochemical observations on the mucosubstances of the nasal glands of the mouse. *The Histochemical Journal*, *6*(5), 543–558. https://doi.org/10.1007/BF01003270

de Góis Morais, P. L. A., Paiva, K. M., Oliveira, R. F., Santana, M. A. D., Guzen, F. P., Engelberth, R. C. G. J., de Souza Cavalcante, J., Nascimento, E. S., & Cavalcanti, J. R. L. P. (2021). Distribution and morphology of calbindin neurons in the Amygdaloid Complex of the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Journal of Chemical Neuroanatomy*, *112*, 101914. https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2020.101914

de la Rosa-Prieto, C., Saiz-Sanchez, D., Ubeda-Bañon, I., Argandoña-Palacios, L., Garcia-Muñozguren, S., & Martinez-Marcos, A. (2010). Neurogenesis in subclasses of vomeronasal sensory neurons in adult mice. *Developmental Neurobiology*, *70*(14), 961–970. https://doi.org/10.1002/dneu.20838

Dennis, J. C., Allgier, J. G., Desouza, L. S., Eward, W. C., & Morrison, E. E. (2003). Immunohistochemistry of the canine vomeronasal organ. *Journal of Anatomy*, *203*(3), 329–338. https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2003.00190.x

Dennis, J. C., Smith, T. D., Bhatnagar, K. P., Bonar, C. J., Burrows, A. M., & Morrison, E. E. (2004). Expression of neuron-specific markers by the vomeronasal neuroepithelium in six species of primates. *The Anatomical Record*, *281A*(1), 1190–1200. https://doi.org/10.1002/ar.a.20124

Devillers, P., Devillers-Tershuren, J., & Beudels-Jamarr, R. C. (2005). *Gazella dama*. In *Sahelo-Saharan antelopes. Status and perspectives. Report on the conservation status of the six Sahelo-Saharan Antelopes* (Vol. 11, pp. 57–70). CMS Technical Series Publication.

Ding, X., & Xie, F. (2015). Olfactory mucosa: Composition, enzymatic localization, and metabolism. In E. R. L. Doty (Ed.), *Handbook of olfaction and gustation* (pp. 63–92). John Wiley & Sons, Inc. https://doi.org/10.1002/9781118971758.ch3

Dulac, C., & Axel, R. (1995). A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell*, *83*(2), 195–206. https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90161-2

Durant, S. M., Wacher, T., Bashir, S., Woodroffe, R., De Ornellas, P., Ransom, C., Newby, J., Abáigar, T., Abdelgadir, M., El Alqamy, H., Baillie, J., Beddiaf, M., Belbachir, F., Belbachir-Bazi, A., Berbash, A. A., Bemadjim, N. E., Beudels-Jamar, R., Boitani, L., Breitenmoser, C., … Pettorelli, N. (2014). Fiddling in biodiversity hotspots while deserts burn? Collapse of the Sahara's megafauna. *Diversity and Distributions*, *20*(1), 114–122. https://doi.org/10.1111/ddi.12157

Eisthen, H. L. (1992). Phylogeny of the vomeronasal system and of receptor cell types in the olfactory and vomeronasal epithelia of vertebrates.

Microscopy Research and Technique, *23*(1), 1–21. https://doi.org/10.1002/jemt.1070230102

Emam, M. A., El-Shafey, A. A., & Kassab, A. A. (2016). Expression of neuronal and non-neuronal markers in the vomeronasal organs of one-humped camel (*Camelus dromedarius*) and Egyptian Water Buffalo (*Bubalus bubalis*). *International Journal of Morphology*, *34*(4), 1211–1217. https://doi.org/10.4067/S0717-95022016000400006

Fortes-Marco, L., Lanuza, E., & Martinez-Garcia, F. (2013). Of pheromones and kairomones: What receptors mediate innate emotional responses?: pheromones and kairomones. *The Anatomical Record*, *296*(9), 1346–1363. https://doi.org/10.1002/ar.22745

Franke, W. W., Schiller, D. L., Moll, R., Winter, S., Schmid, E., Engelbrecht, I., Denk, H., Krepler, R., & Platzer, B. (1981). Diversity of cytokeratins. *Journal of Molecular Biology*, *153*(4), 933–959. https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90460-5

Fu, X., Yan, Y., Xu, P. S., Geerlof-Vidavsky, I., Chong, W., Gross, M. L., & Holy, T. E. (2015). A molecular code for identity in the vomeronasal system. *Cell*, *163*(2), 313–323. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.012

Getchell, M. L., Boggess, M. A., Pruden, S. J., II, Little, S. S., Buch, S., & Getchell, T. V. (2002). Expression of TGF-β type II receptors in the olfactory epithelium and their regulation in TGF-α transgenic mice. *Brain Research*, *945*(2), 232–241. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)02805-6

Goncalves, S., & Goldstein, B. J. (2020). Acute N-acetylcysteine administration ameliorates loss of olfactory neurons following experimental injury in vivo. *The Anatomical Record*, *303*(3), 626–633. https://doi.org/10.1002/ar.24066

Grettenberger, J. F., & Newby, J. E. (1986). The status and ecology of the dama gazelle in the aïr and ténéré national nature reserve, Niger. *Biological Conservation*, *38*(3), 207–216. https://doi.org/10.1016/0006-3207(86)90121-7

Halpern, M. (1987). The organization and function of the vomeronasal system. *Annual Review of Neuroscience*, *10*(1), 325–362. https://doi.org/10.1146/annurev.ne.10.030187.001545

Halpern, M., Martínez-Marcos, A. (2003). Structure and function of the vomeronasal system: an update. *Progress in Neurobiology*, *70*(3), 245–318. https://doi.10.1016/s0301-0082(03)00103-5

Halpern, M., Shapiro, L. S., & Jia, C. (1995). Differential localization of G proteins in the opossum vomeronasal system. *Brain Research*, *677*(1), 157–161. https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00159-N

Halpern, M., Shapiro, L. S., & Jia, C. (1998). Heterogeneity in the accessory olfactory system. *Chemical Senses*, *23*(4), 477–481. https://doi.org/10.1093/chemse/23.4.477

Hart, B. L., Hart, L. A., & Maina, J. N. (1988). Alteration in vomeronasal system anatomy in alcelaphine antelopes: Correlation with alteration in chemosensory investigation. *Physiology & Behavior*, *42*(2), 155–162. https://doi.org/10.1016/0031-9384(88)90291-0

Hart, L. A., & Hart, B. L. (2023). Flehmen, osteophagia, and other behaviors of giraffes (*Giraffa giraffa angolensis*): Vomeronasal organ adaptation. *Animals*, *13*(3), 354. https://doi.org/10.3390/ani13030354

Hermanowicz-Sobieraj, B., Bogus-Nowakowska, K., & Robak, A. (2018). Calcium-binding proteins expression in the septum and cingulate cortex of the adult Guinea pig. *Annals of Anatomy – Anatomischer Anzeiger*, *215*, 30–39. https://doi.org/10.1016/j.aanat.2017.09.009

Holt, W., Abaigar, T., & Jabbour, H. (1996). Oestrous synchronization, semen preservation and artificial insemination in the Mohor gazelle (*Gazella dama mhorr*) for the establishment of a genome resource bank programme. *Reproduction, Fertility and Development*, *8*(8), 1215–1222. https://doi.org/10.1071/RD9961215

Hou, R., Wang, Y., Liang, H., Zhang, Z., Liu, Z., Zhang, B., Zhang, B., & Chen, X. (2015). Animal and cellular models of hepatocellular carcinoma bone metastasis: Establishment and characterisation. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *141*(11), 1931–1943. https://doi.org/10.1007/s00432-015-1958-6

Hsu, C.-N., Lai, W.-T., Lin, Y.-J., & Tain, Y.-L. (2018). Postnatal high-fat diet sex-specifically exacerbates prenatal dexamethasone-induced hypertension: Mass spectrometry-based quantitative proteomic approach. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *57*, 268–275. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.04.006

Ibrahim, D. (2018). Immunolocalization of receptor and chemoreceptor modules in the sheep vomeronasal organ. *Cells, Tissues, Organs*, *205*(2), 85–92. https://doi.org/10.1159/000487758

Ibrahim, D., Nakamuta, N., Taniguchi, K., & Taniguchi, K. (2013). Lectin histochemical studies on the vomeronasal organ of the sheep. *Journal of Veterinary Medical Science*, *75*(9), 1131–1137. https://doi.org/10.1292/jvms.12-0532

Isogai, Y., Si, S., Pont-Lezica, L., Tan, T., Kapoor, V., Murthy, V. N., & Dulac, C. (2011). Molecular organization of vomeronasal chemoreception. *Nature*, *478*(7368), 241–245. https://doi.org/10.1038/nature10437

Iwanaga, T., Han, H., Kanazawa, H., & Fujita, T. (1992). Immunohistochemical localization of protein gene product 9.5 (PGP 9.5) in sensory paraneurons of the rat. *Biomedical Research*, *13*(3), 225–230. https://doi.org/10.2220/biomedres.13.225

Iwanaga, T., Takahashi, Y., & Fujita, T. (1989). Immunohistochemistry of neuron-specific and glia-specific proteins. *Archives of Histology and Cytology*, *52*(Suppl), 13–24. https://doi.org/10.1679/aohc.52.Suppl_13

Jacobs, V. L., Sis, R. F., Chenoweth, P. J., Klemm, W. R., & Sherry, C. J. (1981). Structures of the bovine vomeronasal complex and its relationships to the palate: Tongue manipulation. *Cells, Tissues, Organs*, *110*(1), 48–58. https://doi.org/10.1159/000145412

Jang, S., Kim, B., Kim, J.-S., & Moon, C. (2021). Histology and lectin histochemistry in the vomeronasal organ of Korean native cattle, *Bos taurus coreanae*. *Journal of Animal Reproduction and Biotechnology*, *36*(4), 270–284. https://doi.org/10.12750/JARB.36.4.270

Jia, C., & Halpern, M. (2003). Calbindin D28K immunoreactive neurons in vomeronasal organ and their projections to the accessory olfactory bulb in the rat. *Brain Research*, *977*(2), 261–269. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)02693-3

Jia, C., & Halpern, M. (2004). Calbindin D28k, parvalbumin, and calretinin immunoreactivity in the main and accessory olfactory bulbs of the gray short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. *Journal of Morphology*, *259*(3), 271–280. https://doi.org/10.1002/jmor.10166

Jiang, M., & Bajpayee, N. S. (2009). Molecular mechanisms of go signaling. *Neurosignals*, *17*(1), 23–41. https://doi.org/10.1159/000186688

Johnson, E. W., Eller, P. M., & Jafek, B. W. (1994). Protein gene product 9.5 in the developing and mature rat vomeronasal organ. *Developmental Brain Research*, *78*(2), 259–264. https://doi.org/10.1016/0165-3806(94)90034-5

Khan, M., Yoo, S.-J., Clijsters, M., Backaert, W., Vanstapel, A., Speleman, K., Lietaer, C., Choi, S., Hether, T. D., Marcelis, L., Nam, A., Pan, L., Reeves, J. W., Van Bulck, P., Zhou, H., Bourgeois, M., Debaveye, Y., De Munter, P., Gunst, J., … Van Gerven, L. (2021). Visualizing in deceased COVID-19 patients how SARS-CoV-2 attacks the respiratory and olfactory mucosae but spares the olfactory bulb. *Cell*, *184*(24), 5932–5949.e15. https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.10.027

Kishimoto, J., Keverne, E. B., & Emson, P. C. (1993). Calretinin, calbindin-D28k and parvalbumin-like immunoreactivity in mouse chemoreceptor neurons. *Brain Research*, *610*(2), 325–329. https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)91417-Q

Kondoh, D., Kamikawa, A., Sasaki, M., & Kitamura, N. (2017). Localization of α1-2 fucose glycan in the mouse olfactory pathway. *Cells, Tissues, Organs*, *203*(1), 20–28. https://doi.org/10.1159/000447009

Kondoh, D., Kawai, Y. K., Watanabe, K., & Muranishi, Y. (2022). Artiodactyl livestock species have a uniform vomeronasal system with a vomeronasal type 1 receptor (V1R) pathway. *Tissue and Cell*, *77*, 101863. https://doi.org/10.1016/j.tice.2022.101863

Kondoh, D., Nakamura, K. G., Ono, Y. S., Yuhara, K., Bando, G., Watanabe, K., Horiuchi, N., Kobayashi, Y., Sasaki, M., & Kitamura, N. (2017). Histological features of the vomeronasal organ in the giraffe, *Giraffa camelopardalis*. *Microscopy Research and Technique*, *80*(6), 652–656. https://doi.org/10.1002/jemt.22843

Kondoh, D., Sasaki, M., & Kitamura, N. (2018). Age-dependent decrease in glomeruli and receptor cells containing α1–2 fucose glycan in the mouse main olfactory system but not in the vomeronasal system. *Cell and Tissue Research*, *373*(2), 361–366. https://doi.org/10.1007/s00441-018-2819-9

Kondoh, D., Tanaka, Y., Kawai, Y. K., Mineshige, T., Watanabe, K., & Kobayashi, Y. (2021). Morphological and histological features of the vomeronasal organ in African Pygmy Hedgehog (*Atelerix albiventris*). *Animals*, *11*(5), 1462. https://doi.org/10.3390/ani11051462

Kondoh, D., Tomiyasu, J., Itakura, R., Sugahara, M., Yanagawa, M., Watanabe, K., Alviola, P. A., Yap, S. A., Cosico, E. A., Cruz, F. A., Larona, A. R., Manalad, A. J. F., Masangkay, J. S., Sugiura, Y., Kyuwa, S., Watanabe, S., Une, Y., Omatsu, T., Bando, H., & Kato, K. (2020). Comparative histological studies on properties of polysaccharides secreted by vomeronasal glands of eight *Laurasiatheria* species. *Acta Histochemica*, *122*(3), 151515. https://doi.org/10.1016/j.acthis.2020.151515

Kratzing, J. (1971). The structure of the vomeronasal organ in the sheep. *Journal of Anatomy*, *108*(Pt 2), 247–260.

Krishna, N. S. R., Getchell, M. L., Margolis, F. L., & Getchell, T. V. (1995). Differential expression of vomeromodulin and odorant-binding protein, putative pheromone and odorant transporters, in the developing rat nasal chemosensory mucosae. *Journal of Neuroscience Research*, *40*(1), 54–71. https://doi.org/10.1002/jnr.490400107

Kukekova, A. V., Johnson, J. L., Xiang, X., Feng, S., Liu, S., Rando, H. M., Kharlamova, A. V., Herbeck, Y., Serdyukova, N. A., Xiong, Z., Beklemischeva, V., Koepfli, K.-P., Gulevich, R. G., Vladimirova, A. V., Hekman, J. P., Perelman, P. L., Graphodatsky, A. S., O'Brien, S. J., Wang, X., … Zhang, G. (2018). Red fox genome assembly identifies genomic regions associated with tame and aggressive behaviours. *Nature Ecology & Evolution*, *2*(9), 1479–1491. https://doi.org/10.1038/s41559-018-0611-6

Kunkhyen, T., McCarthy, E. A., Korzan, W. J., Doctor, D., Han, X., Baum, M. J., & Cherry, J. A. (2017). Optogenetic activation of accessory olfactory bulb input to the forebrain differentially modulates investigation of opposite versus same-sex urinary chemosignals and stimulates mating in male mice. *Eneuro*, *4*(2), ENEURO.0010-17.2017. https://doi.org/10.1523/ENEURO.0010-17.2017

Ladewig, J., & Hart, B. L. (1980). Flehmen and vomeronasal organ function in male goats. *Physiology & Behavior*, *24*(6), 1067–1071. https://doi.org/10.1016/0031-9384(80)90049-9

Lamarque, F., Sid'Ahmed, A. A., Bouju, S., Coulibaly, G., & Maïga, D. (2007). Confirmation of the survival of the critically endangered dama gazelle *Gazella dama* in south Tamesna, Mali. *Oryx*, *41*(1), 109–112. https://doi.org/10.1017/S0030605307001561

Landaeta-Hernández, A. J., Ungerfeld, R., & Chenoweth, P. J. (2023). Biostimulation and pheromones in livestock: A review. *Animal Reproduction Science*, *248*, 107154. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.107154

Leinders-Zufall, T., Ishii, T., Chamero, P., Hendrix, P., Oboti, L., Schmid, A., Kircher, S., Pyrski, M., Akiyoshi, S., Khan, M., Vaes, E., Zufall, F., & Mombaerts, P. (2014). A family of nonclassical class I MHC genes contributes to ultrasensitive chemodetection by mouse vomeronasal sensory neurons. *Journal of Neuroscience*, *34*(15), 5121–5133. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0186-14.2014

Leinders-Zufall, T., Lane, A. P., Puche, A. C., Ma, W., Novotny, M. V., Shipley, M. T., & Zufall, F. (2000). Ultrasensitive pheromone detection by mammalian vomeronasal neurons. *Nature*, *405*(6788), 6788. https://doi.org/10.1038/35015572

Liberles, S. D. (2014). Mammalian pheromones. *Annual Review of Physiology*, *76*(1), 151–175. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021113-170334

Loo, S. K., & Kanagasunteram, R. (1972). The vomeronasal organ in tree shrew and slow loris. *Journal of Anatomy*, *112*(Pt 2), 165–172.

Malz, C. R., Knabe, W., & Kuhn, H.-J. (2000). Pattern of calretinin immunoreactivity in the main olfactory system and the vomeronasal system of the tree shrew, *Tupaia belangeri*. *The Journal of Comparative Neurology*, *420*(4), 428–436. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(20000515)420:4<428::AID-CNE2>3.0.CO;2-2

Matayoshi, R., & Otaki, J. M. (2011). Immunohistochemical detection of olfactory-specific sensory transduction proteins in olfactory neuroblastoma. *Neuroscience Research*, *69*(3), 258–262. https://doi.org/10.1016/j.neures.2010.12.006

Matsubara, K., Akaogi, N., Tsuj, S., & Nakamuta, N. (2019). Characteristics of olfactory organs in sika deer (*Cervus nippon*). *Japanese Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, *24*(3), 115–122.

Meisami, E., & Bhatnagar, K. P. (1998). Structure and diversity in mammalian accessory olfactory bulb. *Microscopy Research and Technique*, *43*(6), 476–499. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19981215)43:6<476::AID-JEMT2>3.0.CO;2-V

Meredith, M., Marques, D. M., O'Connell, R. J., & Stern, F. L. (1980). Vomeronasal pump: Significance for male hamster sexual behavior. *Science*, *207*(4436), 1224–1226. https://doi.org/10.1126/science.7355286

Meredith, M., & O'Connell, R. J. (1979). Efferent control of stimulus access to the hamster vomeronasal organ. *The Journal of Physiology*, *286*(1), 301–316. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1979.sp012620

Mombaerts, P. (2004). Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors. *Nature Reviews Neuroscience*, *5*(4), 263–278. https://doi.org/10.1038/nrn1365

Mori, K. (1993). Molecular and cellular properties of mammalian primary olfactory axons. *Microscopy Research and Technique*, *24*(2), 131–141. https://doi.org/10.1002/jemt.1070240205

Nagashima, A., & Touhara, K. (2010). Enzymatic conversion of odorants in nasal mucus affects olfactory glomerular activation patterns and odor perception. *The Journal of Neuroscience*, *30*(48), 16391–16398. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2527-10.2010

Oikawa, T., Shimamura, K., Saito, T. R., & Taniguchi, K. (1993). Fine structure of the vomeronasal organ in the house musk shrew (*Suncus murinus*). *Experimental Animals*, *42*(3), 411–419. https://doi.org/10.1538/expanim1978.42.3_411

Oikawa, T., Shimamura, K., Saito, T. R., & Taniguchi, K. (1994). Fine structure of the Vomeronasal organ in the chinchilla (*Chinchilla laniger*). *Experimental Animals*, *43*(4), 487–497. https://doi.org/10.1538/expanim1978.43.4_487

Ortiz-Leal, I., Torres, M. V., Vargas-Barroso, V., Fidalgo, L. E., López-Beceiro, A. M., Larriva-Sahd, J. A., & Sánchez-Quinteiro, P. (2023). The olfactory limbus of the red fox (*Vulpes vulpes*). New insights regarding a noncanonical olfactory bulb pathway. *Frontiers in Neuroanatomy*, *16*, 1097467. https://doi.org/10.3389/fnana.2022.1097467

Ortiz-Leal, I., Torres, M. V., Villamayor, P. R., Fidalgo, L. E., López-Beceiro, A., & Sanchez-Quinteiro, P. (2022). Can domestication shape Canidae brain morphology? The accessory olfactory bulb of the red fox as a case in point. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, *240*, 151881. https://doi.org/10.1016/j.aanat.2021.151881

Ortiz-Leal, I., Torres, M. V., Villamayor, P. R., López-Beceiro, A., & Sanchez-Quinteiro, P. (2020). The vomeronasal organ of wild canids: The fox (*Vulpes vulpes*) as a model. *Journal of Anatomy*, *237*(5), 890–906. https://doi.org/10.1111/joa.13254

Park, C., Ahn, M., Lee, J.-Y., Lee, S., Yun, Y., Lim, Y.-K., Taniguchi, K., & Shin, T. (2014). A morphological study of the vomeronasal organ and the accessory olfactory bulb in the Korean roe deer, *Capreolus pygargus*. *Acta Histochemica*, *116*(1), 258–264. https://doi.org/10.1016/j.acthis.2013.08.003

Park, C., Yang, W., Bae, Y., Lee, Y., Kang, W., Ahn, M., & Shin, T. (2013). A morphological study of vomeronasal organ of Korean black goat (*Capra*

aegagrus hircus). *Korean Journal of Veterinary Research*, *53*(1), 55–60. https://doi.org/10.14405/kjvr.2013.53.1.055

Park, J., Lee, W., Jeong, C., Kim, H., Taniguchi, K., & Shin, T. (2012). Developmental changes affecting lectin binding in the vomeronasal organ of domestic pigs, *Sus scrofa*. *Acta Histochemica*, *114*(1), 24–30. https://doi.org/10.1016/j.acthis.2011.02.001

Pérez-Revuelta, L., Téllez de Meneses, P. G., López, M., Briñón, J. G., Weruaga, E., Díaz, D., & Alonso, J. R. (2020). Secretagogin expression in the mouse olfactory bulb under sensory impairments. *Scientific Reports*, *10*(1), 21533. https://doi.org/10.1038/s41598-020-78499-5

Pickard, A., Abaigar, T., Green, D., Holt, W., & Cano, M. (2001). Hormonal characterization of the reproductive cycle and pregnancy in the female Mohor gazelle (*Gazella dama mhorr*). *Reproduction*, *122*(4), 571–580. https://doi.org/10.1530/rep.0.1220571

Pickard, A., Holt, W. V., Green, D. I., Cano, M., & Abáigar, T. (2003). Endocrine correlates of sexual behavior in the Mohor gazelle (*Gazella dama mhorr*). *Hormones and Behavior*, *44*(4), 303–310. https://doi.org/10.1016/S0018-506X(03)00155-7

Plendl, J., & Sinowatz, F. (1998). Glycobiology of the olfactory system. *Cells, Tissues, Organs*, *161*(1–4), 234–253. https://doi.org/10.1159/000046461

Poran, N. S. (1998). Vomeronasal organ and its associated structures in the opossumMonodelphis domestica. *Microscopy Research and Technique*, *43*(6), 500–510. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19981215)43:6<500::AID-JEMT3>3.0.CO;2-H

Powers, J. B., & Winans, S. S. (1975). Vomeronasal organ: Critical role in mediating sexual behavior of the male hamster. *Science*, *187*(4180), 961–963. https://doi.org/10.1126/science.1145182

Prince, J. E. A., Cho, J. H., Dumontier, E., Andrews, W., Cutforth, T., Tessier-Lavigne, M., Parnavelas, J., & Cloutier, J.-F. (2009). Robo-2 controls the segregation of a portion of basal vomeronasal sensory neuron axons to the posterior region of the accessory olfactory bulb. *Journal of Neuroscience*, *29*(45), 14211–14222. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3948-09.2009

Rekwot, P. I., Ogwu, D., Oyedipe, E. O., & Sekoni, V. O. (2001). The role of pheromones and biostimulation in animal reproduction. *Animal Reproduction Science*, *65*(3–4), 157–170. https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00223-2

Ren, W., Wang, L., Zhang, X., Feng, X., Zhuang, L., Jiang, N., Xu, R., Li, X., Wang, P., Sun, X., Yu, H., & Yu, Y. (2021). Expansion of murine and human olfactory epithelium/mucosa colonies and generation of mature olfactory sensory neurons under chemically defined conditions. *Theranostics*, *11*(2), 684–699. https://doi.org/10.7150/thno.46750

Richardson, H. N., Nelson, A. L. A., Ahmed, E. I., Parfitt, D. B., Romeo, R. D., & Sisk, C. L. (2004). Female pheromones stimulate release of luteinizing hormone and testosterone without altering GnRH mRNA in adult male Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *General and Comparative Endocrinology*, *138*(3), 211–217. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2004.06.008

Rodewald, A., Gisder, D., Gebhart, V. M., Oehring, H., & Jirikowski, G. F. (2016). Distribution of olfactory marker protein in the rat vomeronasal organ. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, *77*, 19–23. https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2016.04.002

Ryba, N. J. P., & Tirindelli, R. (1997). A new multigene family of putative pheromone receptors. *Neuron*, *19*(2), 371–379. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80946-0

Salazar, I., Barrios, A. W., & Sánchez-Quinteiro, P. (2016). Revisiting the vomeronasal system from an integrated perspective. *The Anatomical Record*, *299*(11), 1488–1491. https://doi.org/10.1002/ar.23470

Salazar, I., Cifuentes, J. M., Sanchez-Quinteiro, P., & Caballero, T. G. (1994). Structural, morphometric, and immunohistological study of the accessory olfactory bulb in the dog. *The Anatomical Record*, *240*(2), 277–285. https://doi.org/10.1002/ar.1092400216

Salazar, I., Cifuentes, J. M., & Sánchez-Quinteiro, P. (2013). Morphological and immunohistochemical features of the vomeronasal system in dogs. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, *296*(1), 146–155. https://doi.org/10.1002/ar.22617

Salazar, I., Lombardero, M., Alemañ, N., & Sánchez Quinteiro, P. (2003). Development of the vomeronasal receptor epithelium and the accessory olfactory bulb in sheep. *Microscopy Research and Technique*, *61*(5), 438–447. https://doi.org/10.1002/jemt.10362

Salazar, I., Lombardero, M., Cifuentes, J. M., Sanchez-Quinteiro, P., & Aleman, N. (2003). Morphogenesis and growth of the soft tissue and cartilage of the vomeronasal organ in pigs. *Journal of Anatomy*, *202*(6), 503–514. https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2003.00183.x

Salazar, I., Lombardero, M., Sánchez-Quinteiro, P., Roel, P., & Cifuentes, J. M. (1998). Origin and regional distribution of the arterial vessels of the vomeronasal organ in the sheep. A methodological investigation with scanning electron microscopy and cutting-grinding technique. *Annals of Anatomy – Anatomischer Anzeiger*, *180*(2), 181–187. https://doi.org/10.1016/S0940-9602(98)80023-X

Salazar, I., & Sanchez-Quinteiro, P. (1998). Supporting tissue and vasculature of the mammalian vomeronasal organ: The rat as a model. *Microscopy Research and Technique*, *41*(6), 492–505. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19980615)41:6<492::AID-JEMT5>3.0.CO;2-P

Salazar, I., Sanchez-Quinteiro, P., Alemañ, N., Cifuentes, J. M., & Troconiz, P. F. (2007). Diversity of the vomeronasal system in mammals: The singularities of the sheep model. *Microscopy Research and Technique*, *70*(8), 752–762. https://doi.org/10.1002/jemt.20461

Salazar, I., Sanchez-Quinteiro, P., & Cifuentes, J. M. (1995). Comparative anatomy of the vomeronasal cartilage in mammals: Mink, cat, dog, pig, cow and horse. *Annals of Anatomy – Anatomischer Anzeiger*, *177*(5), 475–481. https://doi.org/10.1016/S0940-9602(11)80156-1

Salazar, I., Sanchez-Quinteiro, P., & Cifuentes, J. M. (1997). The soft-tissue components of the vomeronasal organ in pigs, cows and horses. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, *26*(3), 179–186. https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.1997.tb00122.x

Salazar, I., & Sánchez-Quinteiro, P. (1998). Lectin binding patterns in the vomeronasal organ and accessory olfactory bulb of the rat. *Anatomy and Embryology*, *198*(4), 331–339. https://doi.org/10.1007/s004290050188

Salazar, I., Sánchez Quinteiro, P., Cifuentes, J. M., Fernández, P., & Lombardero, M. (1997). Distribution of the arterial supply to the vomeronasal organ in the cat. *The Anatomical Record*, *247*(1), 129–136. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199701)247:1<129::AID-AR15>3.0.CO;2-R

Salazar, I., Sanchez Quinteiro, P., Cifuentes, J. M., & Garcia Caballero, T. (1996). The vomeronasal organ of the cat. *Journal of Anatomy*, *188*(Pt 2), 445–454.

Salazar, I., Sánchez-Quinteiro, P., Alemañ, N., & Prieto, D. (2008). Anatomical, immnunohistochemical and physiological characteristics of the vomeronasal vessels in cows and their possible role in vomeronasal reception. *Journal of Anatomy*, *212*(5), 686–696. https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2008.00889.x

Salazar, I., Sanchez-Quinteiro, P., Lombardero, M., & Cifuentes, J. M. (2000). A descriptive and comparative lectin histochemical study of the vomeronasal system in pigs and sheep. *Journal of Anatomy*, *196*(1), 15–22. https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2000.19610015.x

Salazar, I., Sanchez-Quinteiro, P., Lombardero, M., & Cifuentes, J. M. (2001). Histochemical identification of carbohydrate moieties in the accessory olfactory bulb of the mouse using a panel of lectins. *Chemical Senses*, *26*(6), 645–652. https://doi.org/10.1093/chemse/26.6.645

Sankarganesh, D., Kirkwood, R. N., Nagnan-Le Meillour, P., Angayarkanni, J., Achiraman, S., & Archunan, G. (2022). Pheromones, binding proteins, and olfactory systems in the pig (*Sus scrofa*): An updated review. *Frontiers in Veterinary Science*, *9*, 989409. https://doi.org/10.3389/fvets.2022.989409

Sasuga, S., Hidaka, S., Ohkura, S., Okamura, H., & Osada, T. (2013). Gene expression of bovine vomeronasal receptors. *Journal of Biological Sciences*, *7*, 27–42.

Shin, T., Kim, J., Choi, Y., & Ahn, M. (2017). Glycan diversity in the vomeronasal organ of the Korean roe deer, *Capreolus pygargus*: A lectin histochemical study. *Acta Histochemica*, *119*(8), 778–785. https://doi.org/10.1016/j.acthis.2017.10.001

Smith, T. D., Dennis, J. C., Bhatnagar, K. P., Garrett, E. C., Bonar, C. J., & Morrison, E. E. (2011). Olfactory marker protein expression in the vomeronasal neuroepithelium of tamarins (*Saguinus* spp). *Brain Research*, *1375*, 7–18. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.12.069

Smith, T. D., Garrett, E. C., Bhatnagar, K. P., Bonar, C. J., Bruening, A. E., Dennis, J. C., Kinznger, J. H., Johnson, E. W., & Morrison, E. E. (2011). The vomeronasal organ of New World monkeys (*Platyrrhini*). *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, *294*(12), 2158–2178. https://doi.org/10.1002/ar.21509

Smith, T. D., Siegel, M. I., & Bhatnagar, K. P. (2001). Reappraisal of the vomeronasal system of catarrhine primates: Ontogeny, morphology, functionality, and persisting questions. *The Anatomical Record*, *265*(4), 176–192. https://doi.org/10.1002/ar.1152

Suárez, R., Fernández-Aburto, P., Manger, P. R., & Mpodozis, J. (2011). Deterioration of the Gαo vomeronasal pathway in sexually dimorphic mammals. *PLoS One*, *6*(10), e26436. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026436

Takahashi, S., Iwanaga, T., Takahashi, Y., Nakano, Y., & Fujita, T. (1984). Neuron-specific enolase, neurofilament protein and S-100 protein in the olfactory mucosa of human fetuses: An immunohistochemical study. *Cell and Tissue Research*, *238*(2), 231–234. https://doi.org/10.1007/BF00217293

Takami, S. (2002). Recent progress in the neurobiology of the vomeronasal organ. *Microscopy Research and Technique*, *58*(3), 228–250. https://doi.org/10.1002/jemt.10094

Takami, S., Getchell, M. L., Chen, Y., Monti-Bloch, L., Berliner, D. L., Stensaas, L. J., & Getchell, T. V. (1993). Vomeronasal epithelial cells of the adult human express neuron-specific molecules. *Neuroreport*, *4*(4), 375–378. https://doi.org/10.1097/00001756-199304000-00008

Takami, S., Getchell, M. L., & Getchell, T. V. (1995). Resolution of sensory and mucoid glycoconjugates with terminal?-galactose residues in the mucomicrovillar complex of the vomeronasal sensory epithelium by dual confocal laser scanning microscopy. *Cell and Tissue Research*, *280*(2), 211–216. https://doi.org/10.1007/BF00307791

Takigami, S. (2000). Projection pattern of vomeronasal neurons to the accessory olfactory bulb in goats. *Chemical Senses*, *25*(4), 387–393. https://doi.org/10.1093/chemse/25.4.387

Taniguchi, K., Harumi, S., Okamura, M., & Ogawa, K. (1993). Immunohistochemical demonstration of protein gene product 9.5 (PGP 9.5) in the primary olfactory system of the rat. *Neuroscience Letters*, *156*(1–2), 24–26. https://doi.org/10.1016/0304-3940(93)90430-S

Taniguchi, K., & Mikami, S. (1985). Fine structure of the epithelia of the vomeronasal organ of horse and cattle: A comparative study. *Cell and Tissue Research*, *240*(1), 41–48. https://doi.org/10.1007/BF00217556

Tomiyasu, J., Kondoh, D., Sakamoto, H., Matsumoto, N., Haneda, S., & Matsui, M. (2018). Lectin histochemical studies on the olfactory gland and two types of gland in vomeronasal organ of the brown bear. *Acta Histochemica*, *120*(6), 566–571. https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.07.003

Tomiyasu, J., Korzekwa, A., Kawai, Y. K., Robstad, C. A., Rosell, F., & Kondoh, D. (2022). The vomeronasal system in semiaquatic beavers. *Journal of Anatomy*, *241*(3), 809–819. https://doi.org/10.1111/joa.13671

Torres, M. V., Ortiz-Leal, I., Ferreiro, A., Rois, J. L., & Sanchez-Quinteiro, P. (2021). Neuroanatomical and immunohistological study of the main and accessory olfactory bulbs of the Meerkat (*Suricata suricatta*). *Animals*, *12*(1), 91. https://doi.org/10.3390/ani12010091

Torres, M. V., Ortiz-Leal, I., Villamayor, P. R., Ferreiro, A., Rois, J. L., & Sanchez-Quinteiro, P. (2020). The vomeronasal system of the newborn capybara: A morphological and immunohistochemical study. *Scientific Reports*, *10*(1), 13304. https://doi.org/10.1038/s41598-020-69994-w

Torres, M. V., Ortiz-Leal, I., Villamayor, P. R., Ferreiro, A., Rois, J. L., & Sanchez-Quinteiro, P. (2022). Does a third intermediate model for the vomeronasal processing of information exist? Insights from the macropodid neuroanatomy. *Brain Structure and Function*, *227*(3), 881–899. https://doi.org/10.1007/s00429-021-02425-2

Vedin, V., Eriksson, B., & Berghard, A. (2010). Organization of the chemosensory neuroepithelium of the vomeronasal organ of the Scandinavian moose *Alces alces*. *Brain Research*, *1306*, 53–61. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.10.012

Wagner, L., Oliyarnyk, O., Gartner, W., Nowotny, P., Groeger, M., Kaserer, K., Waldhäusl, W., & Pasternack, M. S. (2000). Cloning and expression of secretagogin, a novel neuroendocrine- and pancreatic islet of langerhans-specific Ca^{2+}–binding protein. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(32), 24740–24751. https://doi.org/10.1074/jbc.M001974200

Wang, R., Jiang, S., & Gu, R. (1994). Immunohistochemical study of the olfactory mucosa and vomeronasal organ in rat, Guinea pig and human fetus. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi*, *29*(1), 23–26.

Wildt, D. E., Ellis, S., & Howard, J. G. (2001). Linkage of reproductive sciences: From "quick fix" to "integrated" conservation. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, *57*, 295–307.

Wojtusik, J., Brown, J. L., & Pukazhenthi, B. S. (2017). Non-invasive hormonal characterization of the ovarian cycle, pregnancy, and seasonal anestrus of the female addra gazelle (*Nanger dama ruficollis*). *Theriogenology*, *95*, 96–104. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.02.019

Wysocki, C. J. (1979). Neurobehavioral evidence for the involvement of the vomeronasal system in mammalian reproduction. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *3*(4), 301–341. https://doi.org/10.1016/0149-7634(79)90015-0

Yang, W., Choi, Y., Park, C., Lee, K.-H., Ahn, M., Kang, W., Heo, S.-D., Kim, J., & Shin, T. (2021). Histological and lectin histochemical studies in the vomeronasal organ of the Korean black goat, *Capra hircus coreanae*. *Acta Histochemica*, *123*(2), 151684. https://doi.org/10.1016/j.acthis.2021.151684

Young, J. M., & Trask, B. J. (2007). V2R gene families degenerated in primates, dog and cow, but expanded in opossum. *Trends in Genetics*, *23*(5), 212–215. https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.03.004

Zhang, Z., & Nikaido, M. (2020). Inactivation of ancV1R as a predictive signature for the loss of vomeronasal system in mammals. *Genome Biology and Evolution*, *12*(6), 766–778. https://doi.org/10.1093/gbe/evaa082

Zufall, F., Kelliher, K. R., & Leinders-Zufall, T. (2002). Pheromone detection by mammalian vomeronasal neurons. *Microscopy Research and Technique*, *58*(3), 251–260. https://doi.org/10.1002/jemt.10152

How to cite this article: Torres, M. V., Ortiz-Leal, I., Ferreiro, A., Rois, J. L., & Sanchez-Quinteiro, P. (2023). Immunohistological study of the unexplored vomeronasal organ of an endangered mammal, the dama gazelle (*Nanger dama*). *Microscopy Research and Technique*, *86*(9), 1206–1233. https://doi.org/10.1002/jemt.24392

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5 DISCUSIÓN

Como ya hemos comentado previamente, una de las características fundamentales del SVN es la gran diversidad morfofuncional que presenta a lo largo de las diferentes especies de mamíferos, muy superior en comparación con la de su sistema análogo, el sistema olfativo. Así pues, el SVN exhibe numerosas variaciones estructurales y filogenéticas entre las diferentes especies (Wysocki, 1979). Por otro lado, en comparación con el sistema olfativo, el SVN presenta una mayor diversidad genómica. Los análisis han demostrado que las secuencias genéticas de los receptores del epitelio olfativo principal están bien conservadas, mientras que los receptores del órgano vomeronasal están asociados a una gran variedad de genes (Brennan, 2018; Halpern & Martinez-Marcos, 2003). Esto sugiere que el SVN ha presentado una evolución más dinámica. No debemos olvidar que las relaciones entre estos sistemas reflejan su historia común de adaptaciones ecológicas durante la evolución. Adicionalmente, las feromonas son, por definición, específicas para cada especie, y las diferentes especies tienen diferentes estrategias de comportamiento y reproducción. Por lo tanto, es comprensible que las características del SVN presenten una gran variación interespecífica.

Este aspecto debe tenerse en cuenta a la hora de investigar el SVN, por lo que resulta conveniente la realización de estudios específicos en cada grupo de mamíferos o incluso en cada especie. De este modo, se evita caer en extrapolaciones fundamentadas en el modelo más estudiado, el modelo de los roedores domésticos y de laboratorio (Salazar & Sánchez-Quinteiro, 2009). Es importante enfatizar la incoherencia que supone extrapolar información desde otras especies en el estudio de un sistema que tiene como característica principal la variabilidad morfológica y funcional entre especies. Asimismo, realizar estudios específicos en cada especie o grupo de mamíferos permitirá comprender las bases de esta multiplicidad morfológica, funcional y genómica.

Los estudios realizados y publicados que constituyen el cuerpo de esta tesis, concuerdan con esta hipótesis de partida, pues hemos encontrado una amplia variedad de diferencias significativas entre los cuatro órdenes de mamíferos aquí representados. Estas variaciones son el reflejo de la gran especificidad que presenta el SVN, resultado de la gran adaptación que ha experimentado a lo largo de la evolución de los mamíferos. Estos cambios se establecen con la finalidad de adaptarse a los cambios ambientales y a las exigencias propias de cada estilo de vida, medio ambiente, hábitos alimentarios, etc. Por este motivo, en esta discusión vamos a abordar de forma individual las cuatro especies que han sido objeto de estudio.

USC DE COMPOSTELA

Dentro la amplia diversidad morfofuncional que presenta el SVN, cada una de las especies estudiadas nos ha permitido responder cuestiones específicas. Por ende, no solo hemos aportado y comparado información morfofuncional, sino que hemos abordado cuestiones específicas que plantea cada modelo de SVN según la especie analizada.

Así pues, en el capibara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) se investigó como cuestión específica el grado de desarrollo que presenta el SVN en individuos recién nacidos. Conscientes de la importancia de dicho sistema en el desarrollo perinatal, hemos decidido detallar el grado de madurez y funcionalidad que presenta en esta especie precocial. Para ello, se han empleado el análisis histológico, histoquímico e inmunohistoquímico. Aunque trabajos como el estudio del SVN del elefante asiático (*Elephas maximus*), demostraron que a las 6 semanas de edad el SVN ya comparte similitudes morfológicas con el del adulto (Johnson & Rasmussen, 2002), numerosos estudios detallan el desarrollo del SVN a lo largo del proceso embrionario sin esclarecer el grado de madurez y funcionalidad del SVN en el nacimiento (Garrosa *et al*., 1998), momento que implica numerosas transformaciones que involucran a la comunicación química. Por este motivo y debido a que apenas se han realizado estudios en etapa neonatal, hemos analizado el SVN del capibara en individuos de tan solo un día de vida.

Por otro lado, mediante el estudio del SVN del capibara pudimos valorar el impacto que tuvo la domesticación en este sistema de detección de semioquímicos. El objetivo fue recopilar información sobre el SVN de un roedor salvaje para comprobar si dicho modelo se corresponde con el modelo de los múridos domésticos, el cual es actualmente empleado como modelo representativo entre los roedores. Sin embargo, tanto el ratón doméstico como la rata de laboratorio han sido sometidos a la presión de la selección genética mediante la domesticación. Por tanto, resulta necesario ampliar los conocimientos sobre el SVN de los roedores a especies silvestres para valorar la existencia de posibles diferencias significativas.

En el caso del ualabí, nos planteamos como objetivo abordar el conflicto planteado en el estudio de Schneider *et al*. (2012). Los resultados de dicho estudio concluyeron que el ualabí podría presentar un nuevo modelo de transducción vomeronasal. Hasta el momento, se habían descrito dos modelos. El modelo segregado, cuando el individuo consta de las dos familias de receptores vomeronasales, y el modelo uniforme, en sujetos que solo presentan los receptores V1R. Todas y cada una de las especies de mamíferos estudiados se corresponden con uno de los dos tipos de SVN. De hecho, existe un consenso sobre el deterioro de la vía Gαo en ciertas especies a lo largo de la evolución. Esto supuso la pérdida de los receptores V2R. Sin embargo, los resultados de Schneider *et al*. en el ualabí de Tammar reflejan la expresión única de la familia de receptores V2R en esta especie. Este hallazgo entra en conflicto con las teorías establecidas y dificulta la comprensión de las bases evolutivas de la transducción vomeronasal. Por este motivo, hemos decidido estudiar el SVN del ualabí de Bennett (*Notamacropus rufogriseus*) de cara a verificar los resultados obtenidos por el grupo investigador de Schneider.

Nuestro estudio sobre el BO de la suricata (*Suricata suricatta*) trató dos aspectos específicos. Por un lado, la falta de información morfofuncional sobre el BOP y el BOA en esta especie nos

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

llevó a realizar un profuso estudio de las estructuras integradoras de la información quimiosensorial. En este aspecto, la suricata constituye una especie de especial interés debido a su íntima relación con la comunicación química. Estos animales muestran un comportamiento gregario y mantienen complejas costumbres sociales. Viven en colonias que suelen tener de 5 a 9 individuos, donde una pareja dominante es responsable de la mayor parte de la reproducción (Clutton-Brock *et al*., 1999). El resto de los individuos se organiza para obtener alimento, vigilar posibles peligros y cuidar las crías. Asimismo, pasan gran parte del tiempo en redes de túneles bajo tierra, donde los estímulos visuales presentan menor relevancia. Por todos estos motivos, consideramos que la comunicación química en la suricata tiene un papel esencial. Sin embargo, no se han realizado estudios sobre las estructuras anatómicas que integran dicha información. Así pues, el estudio del BOP y del BOA en la suricata es una gran oportunidad, ya que supone la posibilidad de conocer las características concretas de un BO con un grado de desarrollo presumiblemente significativo.

Por otro lado, identificar las características del BO de la suricata mediante técnicas histológicas, histoquímicas e inmunohistoquímicas nos permitió arrojar luz en el debate taxonómico que presentó esta especie a lo largo de la historia. Durante muchos años, se ubicó de forma ambigua a la suricata dentro del grupo de los cánidos y de los félidos. En cambio, actualmente se considera que la suricata es un feliforme, y se sitúa en la familia de los herpéstidos (Veron *et al*., 2004). Estas conclusiones pueden ser corroboradas atendiendo a las diferencias y similitudes que presenta el SVN de la suricata en comparación con los cánidos y los félidos. Debido a la especificidad del SVN, su estudio y comparación se utiliza como técnica de clasificación taxonómica. Por ende, la investigación del SVN en la suricata también contempla a este objetivo.

En relación con la gacela dama (*Nanger dama*), nos hemos centrado en la obtención de la máxima información de su SVN. Se pretende evaluar el grado de desarrollo de dicho sistema y detallar el papel que desempeña la comunicación química en esta especie en peligro de extinción. Este objetivo se plantea debido a que no existen datos sobre el SVN en la gacela dama. Adicionalmente, dada la escasa población existente de esta especie, el estudio del SVN podría representar un avance inicial hacia la mejora de su condición reproductiva mediante la aplicación de feromonas. Esto se fundamenta en el uso de feromonas que actualmente se lleva a cabo para mejorar los parámetros reproductivos en especies con un SVN bien caracterizado como es el caso de los cerdos (McGlone *et al*., 2019; Archer *et al*., 2022). Asimismo, las feromonas pueden emplearse para reducir el estrés, por lo que serían de utilidad para las gacelas que se encuentren protegidas en centros de recuperación. Este hecho se ha comprobado en varios estudios. A modo de ejemplo, cierta investigación en perros sometidos a cirugía, verificó la eficacia del uso de la feromona DAP para reducir los niveles de estrés y mejorar el bienestar animal en el proceso (Siracusa *et al*., 2010).

A continuación, discutiremos más detalladamente los resultados obtenidos en cada especie. Estos datos se organizan en bloques según la especie investigada para ofrecer una estructura que facilite la comprensión y la lectura. Así pues, en cada bloque se detalla como cada uno de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

los cuatro modelos analizados ha contribuido a resolver las cuestiones específicas planteadas, entre las múltiples cuestiones que presenta un sistema tan diverso como el SVN. Al mismo tiempo, se describen los principales aspectos morfológicos y morfofuncionales observados, y se realiza una comparación de estas características con las que muestran otras especies o grupos de mamíferos.

5.1 CAPIBARA

Actualmente, los modelos de SVN más estudiados y representativos entre los mamíferos son los del ratón y la rata. En ambas especies, el SVN presenta un gran desarrollo morfofuncional. Sin embargo, estas especies comprenden sólo una pequeña fracción de la familia Rodentia. Por lo tanto, optamos por estudiar otro roedor, el capibara, para determinar si el modelo de SVN del ratón y la rata son representativos entre toda la familia de roedores o si bien existen diferencias significativas en otras especies. Asimismo, la mayoría de los roedores estudiados provienen de cepas de laboratorio, que omiten las condiciones naturales. Por ende, decidimos analizar una especie de roedor silvestre, es decir, que no ha sido objeto de selección artificial por parte del ser humano.

Paralelamente, se analizó el desarrollo temprano del SVN al disponer de varios ejemplares de tan solo un día de edad. Esto permite aumentar la escasa información sobre el desarrollo y la implicación del SVN en el momento del nacimiento. Asimismo, teniendo en cuenta el carácter precocial del capibara, investigar individuos recién nacidos nos permitió determinar si el SVN se había adaptado a los requisitos de un entorno desafiante al nacer, y comprender los mecanismos de adaptación observados.

Aunque se dispone de valiosa información sobre la expresión de las subunidades de las proteínas G en el BOA del capibara adulto, hemos ampliado estas observaciones, abordando las principales características morfológicas y neuroquímicas tanto del BOA como del OVN. Nuestro estudio inmunohistoquímico prestó también especial atención a las proteínas G, ya que la nueva información sobre su expresión perinatal podría ser relevante de cara a entender el papel que juega el SVN en esta etapa de la vida. Los capibaras adultos expresan las dos familias de receptores vomeronasales, V1R y V2R, que pueden ser identificadas inmunohistoquímicamente mediante el análisis de la expresión de las proteínas G. Esto se debe a que las células neurorreceptoras V1R poseen específicamente la subunidad αi2 de las proteínas G en su cadena de transducción sensorial, mientras que las células V2R expresan la subunidad αo.

Dado que las proteínas G desempeñan un papel crítico en la cadena de transducción de señales feromonales, su inmunopositividad a lo largo del neuroepitelio del OVN, los nervios vomeronasales y las capas nerviosas y glomerulares del BOA del capibara recién nacido, apunta a la existencia de una madurez completa por parte de este sistema al nacer (Torres *et al*., 2020; Fig. 8E,F). Este hecho es consistente con el carácter precocial del capibara, es decir, las crías

USC DE COMPOSTELA

muestran un grado elevado de madurez cuando nacen. Aunque no existen estudios comparables del desarrollo postnatal temprano del SVN en otros mamíferos precociales, sí se ha observado un patrón comparable en estudios de desarrollo fetal en dos especies precociales: el cerdo (Salazar et al., 2004) y la oveja (Salazar et al., 2003). En ninguno de los dos casos se evaluó la expresión de proteínas G en el SVN, pero sí se observó en los estadios prenatales más avanzados un patrón de expresión de lectinas similar al observado en el capibara neonato e incluso un grado de diferenciación morfológica esencialmente similar al adulto. En el caso concreto de la oveja, ya al inicio del último tercio de la gestación se había completado el desarrollo morfológico, tanto del OVN como del BOA (Salazar et al., 2003).

La expresión de proteínas G observada en el BOA del capibara recién nacido (Torres *et al*., 2020; Fig. 9A,B) establece una clara zonación anteroposterior, idéntica a la observada en el adulto: la proteína Gαi2 se expresa en la zona anterior del BOA y la proteína Gαo en la zona posterior. Esta zonación también es evidenciada con la lectina UEA (Torres *et al*., 2020; Fig. 10C), que tiñe más intensamente el área anterior. Este patrón coincide con el observado en ratones. Sin embargo, un estudio reciente sobre el marcaje de la lectina UEA en el sistema olfativo del ratón sólo pudo identificar dicha zonación en tres de los dieciséis sujetos estudiados (Kondoh *et al*., 2017b). Los autores concluyeron que estas diferencias individuales pueden estar causadas por la presencia o ausencia de señales que activan las células receptoras, o bien, ser el reflejo de la diferencia entre los roedores salvajes y los roedores de laboratorio. La presencia de una zonación anteroposterior marcada por la UEA en el capibara parece reforzar dicha teoría. Paralelamente, la lectina LEA (Torres *et al*., 2020; Fig. 10D) tiñó por igual ambas zonas, y resultó ser un marcador útil para ambos sistemas olfativos.

Aunque el número reducido de individuos disponibles impidió la realización de un estudio estadístico riguroso, todos nuestros ejemplares recién nacidos mostraron una porción caudal mayor que la porción rostral. Esto indica que a partir de la etapa perinatal, el capibara muestra un sesgo hacia un BOA caudal más prominente. Asimismo, esta característica fue descrita previamente en individuos adultos (Suárez *et al*., 2011). Estos resultados, junto con las recientes observaciones sobre los parámetros morfométricos del BOA en dos especies de degúes estrechamente relacionadas con hábitos sociales contrastados, sugieren que algunas características estructurales del BOA están ligadas al estilo de vida de la especie y surgen durante una etapa temprana de la ontogenia (Fernández-Aburto *et al*., 2020).

Adicionalmente, realizamos otros estudios inmunohistoquímicos y morfológicos que confirmaron la funcionalidad del OVN y el BOA en esta etapa temprana. En el OVN, los marcadores de proteínas ligantes de calcio, calretinina y calbindina (Torres *et al*., 2020; Fig. 8K,L) tiñeron los haces nerviosos del parénquima y casi todas las células neuroepiteliales sensoriales, aunque se evidenciaron diferentes poblaciones celulares. Algo similar ocurre en la musaraña, donde la calretinina produce un marcaje intenso en casi todas las células receptoras y en los nervios vomeronasales de individuos prenatales (Malz *et al*., 2002). Ambos marcadores produjeron un marcaje similar en el BOA, tiñendo las capas nerviosa y glomerular, aunque la calbindina produjo una tinción más intensa. Por otra parte, la calretinina produjo un marcaje de

USC

las células mitrales, al igual que se ha visto en estudios prenatales realizados en la musaraña y en el erizo adulto (Briñón *et al*., 2001).

El anticuerpo contra la proteína ácida fibrilar glial marcó un número importante de astrocitos en las capas nerviosas y glomerulares del BOA (Torres *et al*., 2020; Fig. 9C,D). Este hecho es llamativo si se compara con otras especies, ya que en la mayoría de los estudios el desarrollo astrocítico en esta fase temprana apenas resulta perceptible. En el caso de la zarigüeya recién nacida, apenas se vislumbra un ligero marcaje frente a la proteína GFAP (Brunjes *et al*., 1992). Sólo los ratones recién nacidos mostraron un desarrollo astrocítico cercano al del capibara (Salazar *et al*., 2006). Sin embargo, el marcaje con GFAP en ratones se produce en la zona superficial intermedia, que corresponde a un estadio primitivo de la capa plexiforme interna. Por lo tanto, el marcaje temprano de los astrocitos en el capibara recién nacido refuerza la idea de que presenta un SVN con un alto grado de madurez al nacer.

La proteína 2 asociada a los microtúbulos (MAP-2) es un valioso marcador asociado a los árboles dendríticos de las células mitrales. En el BOA del capibara recién nacido, el anticuerpo MAP-2 produce un marcaje difuso (Torres *et al*., 2020; Fig. 9F-H). Esto coincide con lo observado en individuos recién nacidos de otras especies, como las ratas, los ratones y las zarigüeyas (Salazar *et al*., 2006; Dehmelt & Halpain, 2005; Schoenfeld *et al*., 1989; Viereck *et al*., 1989). El anticuerpo contra la proteína marcadora olfativa (OMP) produce un patrón de marcaje intenso en las capas nerviosa y glomerular del BOP. En cambio, apenas produce marcaje en el BOA, al teñir únicamente la capa glomerular y de forma débil (Torres *et al*., 2020; Fig. 9I,J). Se ha observado en otras especies que las capas nerviosas y glomerulares de ambos bulbos olfativos son positivas frente al marcador OMP después del nacimiento. Sin embargo, también se ha visto que la tinción que produce el OMP presenta una diferencia de intensidad considerable entre BOA y BOP, resultando una tinción más intensa en el BOP. Esto se ha observado en roedores como el ratón o la rata (Halpern *et al*., 1998), y en marsupiales como la zarigüeya (Shapiro *et al*., 1997).

Además de estos hallazgos neuroquímicos, nuestro estudio en el capibara recién nacido ha aportado evidencias de ciertas características morfológicas exclusivas de esta especie, tales como, la naturaleza de la cápsula que protege ambos OVNs, la localización dorsal del OVN en la cavidad nasal sobre la apófisis palatina del hueso incisivo, el alto grado de diferenciación morfológica del BOA en esa etapa temprana, y por último, la presencia de una corriente migratoria desde el neuroepitelio del OVN hacia los nervios vomeronasales.

Macroscópicamente, destaca la localización dorsal de ambos OVNs, ya que se apoyan en la apófisis palatina del hueso incisivo, y no en el hueso vómer, como ocurre en la mayoría de las especies (Torres *et al*., 2020; Figs. 1 y 4). Esta topografía sólo es comparable a la descrita en conejos (Villamayor *et al*., 2018), donde los órganos también descansan sobre el proceso palatino, aunque en este caso, la proyección ósea es de menor tamaño, lo que resulta en un menor desplazamiento dorsal de ambos OVNs. Por otro lado, se han descrito dos patrones de comunicación del conducto vomeronasal con el exterior. En el primero, el conducto

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

vomeronasal se abre en el conducto incisivo, como ocurre en la mayoría de los mamíferos domésticos, como vacas, perros, caballos y cerdos (Salazar *et al*., 1997b), así como en los lémures (Smith *et al*., 2015). Pero en el segundo, el OVN desemboca directamente en el meato ventral de la cavidad nasal, en su zona rostral. Este último es el caso de todos los roedores (Vacarezza *et al*., 1981) y lagomorfos (Villamayor *et al*., 2018) estudiados hasta la fecha. Por consiguiente, en el capibara, los conductos vomeronasales se abren directamente en la cavidad nasal. Aunque en la mayoría de las especies la naturaleza de la cápsula vomeronasal es exclusivamente cartilaginosa, hay especies como la rata en las que la cápsula está formada por una fina lámina ósea (Salazar & Sánchez-Quinteiro, 1998) o como los lagomorfos que cuentan con una cápsula de cartílago reforzada externamente por una envoltura ósea (Villamayor *et al*., 2018). En el capibara recién nacido, hemos observado un patrón diferente y hasta ahora inédito en la literatura. La cápsula es anteriormente cartilaginosa, pero a partir de la zona central del órgano es progresivamente sustituida de ventral a dorsal por una lámina ósea que acaba envolviendo completamente al parénquima del OVN en su zona caudal (Torres *et al*., 2020; Figs. 2A y 5A,B).

El desarrollo y la madurez del neuroepitelio receptor en los individuos recién nacidos (Torres *et al*., 2020; Fig. 5E) es equiparable al epitelio altamente diferenciado típico de otro roedor, la rata (Rodewald *et al*., 2016). El parénquima presenta un desarrollo moderado de los vasos sanguíneos (Torres *et al*., 2020; Fig. 5F). En este sentido, el capibara se diferencia de otras especies como el gato (Salazar *et al*., 1997a), el conejo (Villamayor *et al*., 2018) y la vaca (Salazar *et al*., 2008), en las que el desarrollo de la bomba vascular es muy sofisticado. La bomba vomeronasal es el mecanismo fisiológico mediante el cual las feromonas disueltas en fluidos son transportadas al conducto vomeronasal (Meredith *et al*., 1980).

La secreción de las glándulas vomeronasales hacia el conducto del órgano juega un papel vital en los procesos peri-receptores vomeronasales (Takami *et al*., 1995). El OVN del capibara recién nacido muestra un importante desarrollo del tejido glandular, especialmente en el extremo caudal del órgano (Torres *et al*., 2020; Fig. 5B). Sin embargo, en la parte central del conducto, la presencia de glándulas es moderada. Este patrón es análogo al encontrado en otros roedores como ratas, cobayas (Bojsen-Møller, 1964) o ratones (Mendoza & Kühnel, 1987). Asimismo, el carácter glandular del OVN del capibara es tanto PAS + como AA +, lo que contrasta con lo encontrado en la mayoría de los roedores estudiados, que sólo expresan positividad para PAS en la secreción glandular (Pastor *et al*., 1992; Roslinski *et al*., 2000; Oikawa *et al*., 1994). Esta notoria variación en las características de las glándulas dentro del mismo orden puede deberse a la adaptación de los capibaras a la naturaleza semiacuática de su hábitat, que podría requerir un medio específico de interacción feromona-receptor.

Todos los estudios previos sobre las GV de especies pertenecientes al orden Rodentia se realizaron hasta nuestro conocimiento en especímenes adultos. Es decir, la información sobre las etapas prenatal y perinatal es escasa. En el capibara recién nacido encontramos que las GV son reactivas a la lectina UEA-I, específica de las secreciones mucosas (Spicer *et al*., 1983), y a la lectina LEA, que se ha relacionado con la presencia de unidades de ácido siálico y

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

galactosamina en las glándulas (Takami *et al*., 1994). En contraste, han resultado negativas para la lectina BSI-B_4 específica de la α-galactosa. Estos resultados coinciden con los encontrados en ratones recién nacidos (Salazar *et al*., 2001), aunque en este caso el desarrollo glandular es menos notable. Por otra parte, los mamíferos precociales muestran un desarrollo prenatal de las glándulas vomeronasales significativo. De hecho, se encontraron glándulas LEA + en fetos de oveja en el segundo trimestre de gestación y en fetos de cerdo en la cuarta semana de gestación (Salazar *et al*., 2003; Salazar *et al*., 2004).

En el capibara recién nacido, los nervios vomeronasales se concentran en la zona medial del OVN, formando fascículos nerviosos que abandonan el parénquima en sentido dorsal. Un punto excepcional sobre el que no hay información en la literatura es la profusa migración celular que se produce desde el epitelio sensorial hasta los fascículos nerviosos (Torres *et al*., 2020; Fig. 6). Esta migración celular fue positiva en el marcaje inmunohistoquímico con anti-GAP-43 y en el marcaje histoquímico con las lectinas UEA y LEA, pero fue negativa cuando se marcó con anti-LHRH. Esto indica que la migración no es análoga a la descrita en fetos prenatales de rata y ratón, la cual se produce desde la parte vomeronasal de la placoda olfativa hasta el hipotálamo y está compuesta mayoritariamente por células LHRH positivas (Schwanzel-Fukuda & Pfaff, 1989). Es difícil formular una hipótesis sobre la importancia de estas células en el capibara, ya que se trata de un hallazgo sin precedentes tanto en los nervios olfativos como en los vomeronasales. Por otro lado, aunque en futuros estudios se deberá aclarar la naturaleza y el destino de estas células, la inmunopositividad para GAP-43 es indicativa de su naturaleza neuronal.

En cuanto a la morfología del BOA, nuestras observaciones en el capibara recién nacido muestran que desde el nacimiento, la organización macroscópica y microscópica ya está definida. Así pues, se observa un patrón laminar nítidamente diferenciado (Torres *et al*., 2020; Fig. 7), similar al encontrado en otros roedores (Salazar *et al*., 2001), lagomorfos (Villamayor *et al*., 2020), marsupiales (Skeen & Hall, 1977) y prosimios (Stephan, 1965). Desde el punto de vista macroscópico, llama la atención que en los capibaras analizados en un estudio previo (Suárez *et al*., 2011) se describe la llegada del nervio vomeronasal al BOA por la cara lateral. Nuestras disecciones y series histológicas evidencian que la llegada del nervio vomeronasal al BOA se produce por la cara medial (Torres *et al*., 2020; Fig. 7D), como ocurre en otros roedores y en la mayoría de los mamíferos estudiados hasta la fecha (McCotter, 1912). Sin embargo, la cobaya, un roedor Hystricognathi como el capibara, constituye una excepción a este patrón, ya que en esta especie la llegada del nervio se produce por la parte ventrolateral del bulbo (McCotter, 1912). Aunque no tuvimos acceso a individuos adultos que pudieran ayudarnos a ratificar este aspecto, el acceso a las Colecciones de Cerebros de Mamíferos Comparados de las Universidades de Wisconsin y Michigan State (https://brain museum.org/) nos permitió estudiar una serie de imágenes de secciones transversales del cerebro del capibara adulto teñidas con Nissl. En el espécimen 62-621, sección 160, se muestra nítidamente la llegada del nervio vomeronasal al BOA desde el lado medial del hemisferio cerebral izquierdo. Se recomienda realizar futuros estudios con la finalidad de aclarar esta cuestión.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En resumen, nuestros resultados muestran que, en el primer día de vida, el SVN del capibara posee cinco características principales. Un OVN que se comunica directamente con la cavidad nasal, e indirectamente con la cavidad oral. Un OVN y un BOA que son morfológicamente similares a los del adulto. Glándulas vomeronasales secretoras activas. Posee un patrón de expresión de las proteínas Gαo y Gαi2 en el epitelio neurosensorial, en los nervios vomeronasales y en las capas nerviosa y glomerular del BOA idéntico al descrito en el capibara adulto. Finalmente, los marcadores neuroquímicos empleados mostraron mayoritariamente una actividad típica de individuos adultos.

Sobre la base de estos resultados, se puede llegar a la conclusión general de que el SVN del capibara recién nacido es capaz de establecer la misma función que en la etapa de adulto. Si añadimos a esto nuestras observaciones sobre el grado de diferenciación del BOA y la activa migración celular producida en el epitelio del OVN, la cual no está descrita en ninguna otra especie de mamífero, podemos concluir considerando al capibara como un excelente y prometedor modelo para el estudio de la comunicación química en los primeros días de vida.

5.2 UALABÍ

El estudio de los patrones de expresión de la subunidad α de las proteínas Gi2 y Go ha sido crucial para entender los mecanismos de transducción vomeronasal, pues ambas se asocian a las dos principales familias de receptores vomeronasales, V1R y V2R. La proteína Gαi2 se emplea como marcador de células V1R, es decir, células que expresan el primer tipo de receptor vomeronasal. Por otra parte, la proteína Gαo se expresa en las células V2R (Wettschureck & Offermanns, 2005).

En el BOA, los NVNs ingresan formando la capa nerviosa. En dicha capa, se expresan ambas proteínas G siguiendo una zonación topográfica anteroposterior. La región anterior expresa el marcador Gαi2 y la posterior el marcador Gαo. Este modelo segregado es típico de las especies pertenecientes a los órdenes Rodentia, Lagomorpha, Afrosoricida y Didelphimorphia (Suárez *et al*., 2011). Sin embargo, se observa un deterioro de la vía Gαo en especies pertenecientes a órdenes tan diversos como Soricidae, Hyracoidea, Perissodactyla, Artiodactyla, Carnivora o Primates (Kondoh *et al*., 2022). En estas especies, la capa nerviosa y su terminación en los glomérulos sólo expresan la proteína Gαi2. Así pues, presentan un modelo uniforme de transducción vomeronasal.

Este escenario se complicó con la publicación de un estudio sobre el SVN del ualabí de Tammar (*Notamacropus eugenii*) en el año 2012. Dicha publicación, reveló inesperadamente que este animal podría constituir un modelo alternativo de organización vomeronasal. En sus hallazgos, las células neurorreceptoras del SVN del ualabí de Tammar expresaron únicamente la proteína Gαo tanto a nivel del OVN como del BOA (Schneider *et al*., 2012). Estos resultados sugieren la existencia de un tercer modelo de transducción vomeronasal, diferente a los tipos segregado y uniforme descritos anteriormente. Conscientes de la disrupción que suponen estos hallazgos

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

en los conocimientos establecidos sobre la transducción vomeronasal, los autores de dicho estudio advirtieron que sus resultados debían tomarse con precaución.

De hecho, la observación de que la proteína anti-Gαo sólo se expresaba en una subpoblación de células neurorreceptoras del epitelio vomeronasal y no en toda la población de neuronas vomeronasales resultaba un tanto atípica, ya que en el modelo uniforme previamente descrito, todas las neuronas vomeronasales se marcan con Gαi2. Para explicar este bajo número de células Gαo-positivas, los autores plantearon la hipótesis de una afinidad reducida del anticuerpo utilizado. Sin embargo, no se han descrito en la literatura otros ejemplos de un déficit de selectividad similar en respuesta al uso de anticuerpos anti-Gαo.

Más críticamente, el inmunomarcaje del BOA en el ualabí de Tammar con el marcador Gαo sólo ha sido realizado en este estudio (Schneider *et al*. 2012; Fig. 6E), por lo que no disponemos de otras referencias que apoyen o refuten los resultados. El protocolo de tinción seguido por estos autores resultó en un patrón de marcaje muy débil y al mismo tiempo restringido a una pequeña área en las capas superficiales del BOA, donde se reciben proyecciones de las células neurorreceptoras vomeronasales. Por el contrario, en todas las demás especies estudiadas, tanto del modelo segregado como del uniforme, los marcadores Gαo y Gαi2 se expresan en todo el espesor de las capas superficiales. Esto incluye las capas nerviosa y glomerular. Lamentablemente, los autores no especifican el anticuerpo empleado que mostró un patrón negativo al marcador Gαi2 tanto en el OVN como en el BOA, no proporcionándose información ni de la fuente comercial ni del número de lote del anticuerpo, lo que impide cualquier comparación con otros estudios sobre la expresión de la proteína Gαi2 en el SVN que hayan utilizado el mismo anticuerpo.

Hasta la fecha, no se ha publicado ningún otro estudio que refuerce o rechace la posible existencia de este tercer modelo de organización atendiendo a las vías de transducción vomeronasal. Por lo tanto, hemos decidido realizar un estudio morfofuncional del SVN del ualabí de Bennett (*Notamacropus rufogriseus*) para caracterizar los patrones de expresión de las proteínas G en esta especie. De este modo, podremos arrojar luz sobre la propuesta de la presencia de un tercer modelo de transducción vomeronasal en los macropódidos.

Nuestro estudio inmunohistoquímico de las proteínas G en el SVN del ualabí de Bennett reveló un patrón de marcaje inmunohistoquímico canónico tanto para Gαi2 como para Gαo en el OVN y el BOA de todas las muestras estudiadas. El patrón de marcaje observado en el neuroepitelio vomeronasal del ualabí de Bennett utilizando el marcador Gαo (Torres *et al*., 2022a; Fig. 10A-C) fue idéntico al descrito en el ualabí de Tammar (Schneider *et al*., 2012; Figs. 3A y B), en el que sólo se marcó una pequeña fracción de células neurorreceptoras. Los núcleos de estas células se distribuyeron a lo largo de todo el espesor del neuroepitelio, con una tinción muy fuerte en los somas y en las estructuras en forma de vellosidades que sobresalen desde las terminaciones de las células receptoras hasta el lumen del OVN. Sin embargo, mientras que Schneider *et al*. no obtuvieron un inmunomarcaje Gαi2 positivo en el OVN, nosotros observamos un abundante número de células inmunopositivas en el neuroepitelio receptor

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

vomeronasal (Torres *et al*., 2022a; Fig. 10D). Adicionalmente, la fuerte inmunopositividad identificada en los axones vomeronasales, tanto en la lámina propia como en la mucosa nasal, confirmó la naturaleza neurorreceptora de estas células (Torres *et al*., 2022a; Fig. 10E).

Al extender la caracterización inmunohistoquímica de la expresión de la proteína G al BOA, pudimos verificar la existencia del patrón de zonación anteroposterior típico de las especies de mamíferos pertenecientes al modelo segregado. Los axones vomeronasales que alcanzaban la zona anterior del BOA sólo expresaban Gαi2, mientras que los que alcanzaban la zona posterior expresaban únicamente la subunidad Gαo. El inmunomarcaje de estas dos proteínas G reveló por tanto un patrón complementario coherente con lo observado en las especies con patrón segregado. Asimismo, se observó positividad de Gαo en la capa glomerular de la zona anterior positiva para Gαi2. Dicho estrato contiene numerosas proyecciones dendríticas de neuronas mitrales y otras neuronas ubicadas en capas más profundas de la región anterior, de forma similar a las observaciones descritas por Takigami *et al*. (2004), Villamayor *et al*. (2018) y Torres *et al*. (2020). La positividad para el marcador Gαo observada por Schneider *et al*. en la zona anterior del BOA del ualabí de Tammar es, por tanto, probablemente debida a la presencia de proyecciones de células Gαo-positivas localizadas en la parte anterior del neuropilo, sobre los glomérulos que se encuentran en esta zona. Sin embargo, debido a que estas proyecciones no se originan en los axones vomeronasales, este marcaje Gαo glomerular anterior no puede considerarse una justificación del modelo uniforme.

El empleo de la lectina UEA (*Ulex Europaeus*) proporcionó pruebas adicionales de la segregación de la información vomeronasal en el ualabí, revelando el marcaje selectivo de la zona anterior del BOA. La afinidad de la lectina UEA por la zona anterior del BOA ha sido reportada en todas las especies pertenecientes al modelo de segregación en las que se ha investigado este marcador histoquímico, incluyendo el hámster (Taniguchi *et al*., 1993), el ratón (Salazar *et al*., 2001; Salazar & Sánchez-Quinteiro, 2003; Kondoh *et al*., 2017b), la rata (Salazar & Sánchez Quinteiro, 1998), y el capibara (Torres *et al*., 2020). Sin embargo, los estudios que emplearon el marcaje con UEA en especies pertenecientes al modelo uniforme, incluyendo el cerdo (Salazar *et al*., 2000), el gato (Salazar & Sánchez-Quinteiro, 2011), el perro (Salazar *et al*., 2013) y la cabra (Mogi *et al*., 2007), no han mostrado en ningún caso evidencia de zonificación en el BOA.

Así pues, los patrones de expresión observados para las proteínas Gαi2 y Gαo en el SVN del ualabí y el establecimiento de un claro patrón de zonificación el cual fue confirmado por la lectina UEA, contradicen la existencia de un hipotético tercer modelo de procesamiento de la información vomeronasal, como el descrito por Schneider *et al*. (2012). Aunque estos autores realizaron su estudio en el ualabí de Tammar (*Notamacropus eugenii*), y nuestro estudio se realizó en el ualabí de Bennett (*Notamacropus rufogriseus*), es poco probable que este hecho explique las diferencias observadas en el marcaje inmunohistoquímico. Hasta nuestro conocimiento, nunca antes se han notificado diferencias tanto en la estructura como en los patrones de expresión de las proteínas G del BOA entre especies pertenecientes al mismo género o familia (Meisami & Bhatnagar, 1998; Halpern & Martínez-Marcos, 2003).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Adicionalmente, las principales características morfológicas e histológicas del SVN descritas por Schneider *et al*. son indistinguibles de las encontradas por nosotros en el ualabí de Bennett. De este modo, la comparación entre los resultados de Schneider *et al*. para el OVN (2008) y el BOA (2012) en el ualabí de Tammar con nuestras observaciones en el ualabí de Bennett revela que ambas especies comparten numerosos aspectos fundamentales. Este es el caso de la apertura del OVN al conducto nasopalatino, la forma semilunar del conducto vomeronasal, la estratificación y celularidad del epitelio neurorreceptor y la presencia de numerosas glándulas vomeronasales PAS-positivas en el parénquima lateral. Asimismo, ambas especies comparten una disposición comparable de grandes vasos sanguíneos alrededor del conducto vomeronasal a lo largo de sus planos medial y lateral. Paralelamente, se describe la presencia de una profusa inervación dorsal, medial, ventral y ventrolateral no mielinizada en ambas especies (Schneider *et al*., 2008; Fig. 3B), que se encarga de transmitir la información recogida por el neuroepitelio sensorial vomeronasal al BOA. Esta disposición de los axones vomeronasales en el parénquima resulta atípica, ya que no se ha descrito previamente en el OVN de ninguna otra especie de mamífero no macropódido.

En ambas especies, los haces nerviosos abandonan el OVN a través de una abertura dorsolateral en la cápsula vomeronasal, que es cartilaginosa en ambas especies. Otro rasgo común al OVN de ambos macropódidos, observado por Schneider *et al*. (2008) y Sánchez-Villagra (2001) en el ualabí de Tammar, es que la cápsula vomeronasal caudal no encierra a todo el parénquima del OVN, de manera que la porción posterior del OVN está libre del cartílago circundante. Se ha informado de un hallazgo similar en otros marsupiales, como *Notoryctes* (Sweet, 1904) y *Caenolestes* (Broom, 1926).

La información disponible para el BOA del ualabí de Tammar se limita al estudio de su estructura laminar mediante tinciones de hematoxilina-eosina y Nissl y al patrón de expresión de las subunidades Gα (Schneider *et al*., 2012). Nuestro trabajo amplía estas observaciones histológicas mediante el uso adicional de la tinción de Tolivia, que permite caracterizar la laminación del BOA con mayor definición, incluyendo su relación con el tracto olfativo lateral y la organización de las células mitrales. Estos aspectos parecen comparables en el ualabí de Bennet a los descritos en especies con BOAs muy desarrollados, como los roedores (Meisami & Bhatnagar, 1998) y lagomorfos (Villamayor *et al*., 2020). De igual manera, nuestro estudio inmunohistoquímico permitió la caracterización de la afinidad de las lectinas UEA y LEA, a la vez que la caracterización inmunohistoquímica mediante los marcadores OMP, MAP2, GAP43 y GFAP, empleados por primera vez en el SVN de esta familia de marsupiales.

El marcaje con UEA, mencionado anteriormente como marcador diferencial de la zona anterior del BOA que cuenta con un patrón de distribución análogo al de Gαi2, no es específico del SVN en el ualabí de Bennett. Es decir, también se observó marcaje en las capas superficiales del BOP, mostrando una distribución similar a la observada en roedores (Torres *et al*., 2020) y en cerdos (Salazar *et al*., 2000). La lectina LEA produce marcaje en todos los mamíferos analizados, lo que se ha investigado en los neuroepitelios vomeronasal y olfativo (Park *et al*., 2012; Lee *et al*., 2016) y en las capas nerviosa y glomerular del BOA y del BOP del ratón

USC DE COMPOSTELA

(Salazar *et al*., 2001), la oveja, el cerdo (Salazar *et al*., 2000) y el conejo (Villamayor *et al*., 2020). En el ualabí, a diferencia de la UEA, LEA produce un patrón de marcaje sin zonación, similar al patrón observado con la anti-OMP, un marcador de células olfativas y vomeronasales maduras (Bock *et al*., 2009), e idéntico al patrón de LEA observado en el BOA del conejo, una especie en la que la zonación determinada por las proteínas G no puede ser discriminada usando LEA y OMP (Villamayor *et al*., 2020).

El anticuerpo contra GAP-43 es uno de los marcadores que mejor caracterizan los procesos neuronales en crecimiento y regeneración (Ramakers *et al*., 1992). Mediante su empleo, fuimos capaces de identificar axones en crecimiento en el BOA del ualabí de Bennet, sin que se observaran diferencias entre las zonas anterior y posterior. Sin embargo, otro de los marcadores utilizados, frente a GFAP, mostró una tinción más pronunciada de los componentes gliales en la porción posterior del BOA en relación con el segmento anterior. Dicho patrón no ha sido reportado previamente en otros estudios de este marcador en el BOA de mamíferos (Salazar *et al*., 1994, 2006), por lo que debe ser examinado con más detalle en futuros estudios de cara a interpretar su significado.

De acuerdo con nuestras observaciones la calbindina (CB) y la calretinina (CR) se expresan en la totalidad del SVN del ualabí, a lo largo del neuroepitelio del OVN, los nervios vomeronasales y el BOA. Para ambos marcadores, la inmunotinción del OVN comprende el soma y las dendritas en un patrón similar al descrito en el ratón (Kishimoto *et al*., 1993). En el caso de las ratas, la anti-CR marca la mayoría de las células neurorreceptoras, mientras que la anti-CB sólo tiñe una subpoblación neuronal (Jia & Halpern, 2003). La distribución del marcaje de la anti-CB y la anti-CR en el BOA del ualabí de Bennett se concentra en las fibras vomeronasales y en los glomérulos, marcando las capas nerviosa y glomerular en un patrón análogo al mostrado por otras especies, como el conejo (Villamayor *et al*., 2020) o el capibara (Torres *et al*., 2020). En el caso de otros marsupiales como la zarigüeya, se observaron diferencias significativas en los patrones de expresión de la CB y la CR en el BOA en comparación con el patrón del ualabí de Bennett. En el BOA de la zarigüeya, las neuronas marcadas con anti-CB se encontraban en todas las capas, exceptuando en la capa nerviosa y las células periglomerulares. La CR muestra en la zarigüeya un patrón de expresión análogo al encontrado en el ualabí, aunque en el caso de la zarigüeya, la anti-CR también marca las células mitrales y discrimina una zonación anteroposterior. Esto se refleja mediante la presencia de una tinción más intensa en la zona posterior del BOA respecto a su parte anterior (Jia & Halpern, 2004).

En general, el SVN del ualabí de Bennett muestra un grado de diferenciación y de diversidad histoquímica y neuroquímica comparable al de las especies que cuentan con un mayor desarrollo del SVN. La existencia del tercer tipo intermedio en el procesamiento de la información vomeronasal reportado en el ualabí de Tammar (*Notamacropus eugenii*) no es apoyado por nuestros hallazgos histoquímicos e inmunohistoquímicos en el ualabí de Bennett (*Notamacropus rufogriseus*). Confirmamos la expresión efectiva de las dos familias principales de receptores vomeronasales en el SVN del ualabí de Bennett. Asimismo, nuestra contribución

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

amplía la información morfológica, histoquímica e inmunohistoquímica disponible sobre el SVN de los macropódidos y de los marsupiales en general.

5.3 SURICATA

El estudio realizado en la suricata describe una completa caracterización neuroanatómica e inmunohistoquímica del primer centro de integración en el cerebro de la información procesada por los sistemas olfativo y vomeronasal, los bulbos olfativos principal y accesorio, respectivamente. A pesar de la amplia gama de comportamientos y respuestas fisiológicas mediadas por señales químicas que se han descrito en esta especie, no se disponía de información neuroanatómica ni inmunohistoquímica del bulbo olfativo de la suricata. De hecho, hasta donde sabemos, no hay información disponible sobre dichos aspectos del bulbo olfativo en toda la familia Herpestidae. Únicamente han recibido una breve mención las células periglomerulares (CPg) dopaminérgicas del BOP de la mangosta, en un estudio sobre los sistemas de neurotransmisores expresados en el cerebro de dicha especie (Pillay *et al*., 2017).

En términos generales, nuestras observaciones indican que el BOP de la suricata muestra el patrón general de citoarquitectura observado en todos los carnívoros. Sin embargo, el BOA presenta importantes diferencias, lo cual no es sorprendente considerando la gran diversidad genómica y morfológica que se ha descrito para esta estructura en otros mamíferos (Grus & Zhang, 2004; Salazar & Sánchez-Quinteiro, 2009). En la suricata, estas diferencias pueden ser el reflejo de las numerosas peculiaridades de comportamiento social y reproductivo que la especie presenta, muchas de las cuales están mediadas por señales químicas (Gorman & Trowbridge, 1989).

Los patrones de laminación y citoarquitectura observados en el BOP de la suricata no difieren significativamente de los encontrados en otros carnívoros (Willey, 1973; Nadi *et al*., 1980), ni de los patrones que exhiben especies pertenecientes a otros órdenes de mamíferos. En particular, primates como el macaco (Alonso *et al*., 1998), artiodáctilos como el hipopótamo (Kondoh *et al*., 2017a) y la ballena (Kishida *et al*., 2015) proboscidios como el elefante (Ngwenya *et al*., 2011) y roedores como los ratones (Schröder *et al*., 2020) muestran patrones en el BOP similares a la suricata. El BOP de la suricata muestra un notable desarrollo del estrato glomerular, que contiene un número abundante de células periglomerulares (CPg) en la zona profunda, una amplia capa mitral y la organización de las células mitrales perfectamente alineadas. Las células granulares del BOP de la suricata están organizadas en racimos, y el desarrollo de la zona subventricular (ZSV) resulta particularmente llamativo, ya que se caracteriza por una densa acumulación de células. Resulta llamativo como la ZSV de la suricata es superior en su desarrollo a la descrita en el BOP del feto de perro (Orechio *et al*, 2018), el cual se emplea como un modelo más representativo que el de los roedores para los tipos de eventos neurogénicos que ocurren en los seres humanos (Fernández-Flores *et al*., 2018). Es significativo el hecho de que la ZSV es el área del cerebro adulto que tiene la mayor capacidad de regeneración constitutiva de nuevas células neuronales (Alvarez-Buylla & García-Verdugo,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2002; Sohn *et al*., 2015). El BOP constituye el destino final de las nuevas células neuronales generadas en los nichos neurogénicos centrales de la ZSV, que viajan a través de la corriente migratoria rostral hacia el bulbo olfativo (Doetsch & Alvarez-Buylla, 1996; Cayre *et al*., 2009).

Aunque la organización interna del BOA de los mamíferos es predominantemente laminar, se han descrito importantes variaciones estructurales y filogenéticas (Meisami & Bhatnagar, 1998). El BOA está completamente desarrollado en algunos grupos de mamíferos, tales como los roedores (Kondoh *et al*., 2018), marsupiales (Jia & Halpern, 2004; Schneider *et al*., 2012; Torres *et al*., 2022a), primates (Skeen & Hall, 1977) y artiodáctilos (Park *et al*., 2014). Sin embargo, en otras especies, como el elefante africano (Ngwenya *et al*., 2011), el manatí de las Indias Occidentales (Mackay-Sim *et al*., 1985) o los seres humanos (Trotier *et al*., 2000), el BOA está ausente o aún no ha sido identificado. Por otro lado, en especies como el visón (Salazar *et al*., 1995), el hurón (Kelliher *et al*., 2001) y algunos murciélagos (Frahm & Bhatnagar, 1980) el BOA está presente pero muestra poco desarrollo. Esto se manifiesta en su pequeño tamaño y en la ausencia general de una citoarquitectura típica, ya que muestra una escasa diferenciación entre las capas de su BOA (Meisami & Bhatnagar, 1998).

Las suricatas pertenecen al orden Carnivora, por lo tanto, resulta interesante comparar su BOA con el de otras especies de carnívoros, tales como los cánidos y los félidos, cuyos SVN han sido estudiados en profundidad. El gato (*Felis silvestris catus*) y el perro (*Canis lupus familiaris*) proporcionan ejemplos sorprendentes de la gran disparidad en el grado de diferenciación que puede existir en la organización estructural del BOA. El BOA del gato está bien desarrollado, es apreciable macroscópicamente y muestra una clara definición de capas (Salazar & Sánchez-Quinteiro, 2011). En contraste, el escaso grado de diferenciación observado en el BOA del perro resulta sorprendente (Salazar *et al*., 2013; Salazar *et al*., 1994; Nakajima *et al*., 1998). Durante mucho tiempo se ha considerado un tema controvertido porque contradice las importantes funciones que desempeñan las comunicaciones quimiosensoriales basadas en feromonas (Riddell *et al*., 2021) y los comportamientos altamente sociales típicos de esta especie (Pageat & Gaultier, 2003; Kaminski & Marshall-Pescini, 2014). En 1902, Ramón y Cajal (Cajal, 1902) descartó la existencia de un BOA en el perro. Sin embargo, en los años 1956 (Jawlowski, 1956) y 1968 (Miodonski, 1968), se identificó un BOA putativo en los cánidos aunque estos estudios no fueron concluyentes. Adicionalmente, las pruebas presentadas en dichos estudios consistían en dibujos y no en imágenes reales. En cambio, sus descripciones se corresponden con los hallazgos reportados por el grupo de investigadores de Salazar años más tarde (Salazar *et al*., 1992), quienes finalmente caracterizaron el BOA del perro empleando estudios histoquímicos de lectinas.

De acuerdo con nuestras observaciones, en la suricata, al igual que en los cánidos, el BOA es difícil de identificar macroscópicamente. Sin embargo, microscópicamente, el patrón de laminación en la suricata es más definido que en los perros, asemejándose más al patrón descrito en los gatos. Asimismo, el BOA de la suricata incluye glomérulos bien definidos, un estrato mitral plexiforme amplio con células principales relativamente numerosas, y células granulares que se organizan en racimos. Estas similitudes no resultan inesperadas ya que las suricatas

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

pertenecen al suborden Feliformia. Sin embargo, el grosor de las capas, el grado de diferenciación glomerular y el número de células encontradas en el BOA de la suricata parecen ser inferiores a los observados en el gato. Estas diferencias sólo podrán ser confirmadas mediante la realización de un estudio morfométrico riguroso que emplee un número mínimo de ejemplares.

Estas observaciones adquieren mayor relevancia en el contexto del debate sobre la clasificación taxonómica de la suricata. Su asignación dentro de los feliformes ha oscilado entre las familias Herpestidae y Viverridae (Hughes, 2020). Actualmente, se considera a la suricata un herpéstido, junto con un gran número de especies de mangostas que comparten con ella una amplia gama de complejidades sociales. La gran diversidad morfológica que presenta el SVN entre especies ha servido como herramienta fructífera para establecer relaciones filogenéticas entre diferentes especies de mamíferos e identificar vías evolutivas (Broom, 1900). A pesar del advenimiento de las técnicas genómicas, que han hecho posible la caracterización a nivel poblacional de la variabilidad genética con una resolución inimaginable hasta hace poco, el estudio de las características morfológicas sigue siendo un elemento crucial en la clasificación taxonómica de los mamíferos (Yohe & Krell, 2023). El SVN se mantiene como una referencia importante para estos estudios taxonómicos (Wöhrmann-Repenning, 1991; Sanchez-Villagra, 2001). Futuros estudios sobre las características neuroanatómicas y neuroquímicas del OVN y del BOA de la suricata, combinados con futuras observaciones en otras especies de vivérridos y herpéstidos, pueden ayudar a aclarar este debate filogenético.

Entre los diversos marcadores inmunohistoquímicos empleados en este estudio, el marcaje de proteínas G tiene especial relevancia debido a que proporciona información sobre la expresión de los receptores vomeronasales (RV) implicados en la detección de semioquímicos sociosexuales. Tal como hemos comentado en los apartados anteriores, las proteínas G son componentes de las cascadas de señalización celular que se activan en los receptores vomeronasales (Dulac & Torello, 2003) estando asociadas las subunidades Gαi2 y Gαo a las dos familias primarias de RV, V1R y V2R, respectivamente (Shinohara *et al*., 1992; Jia & Halpern, 1996). Nuestros resultados sobre la expresión de las subunidades de la proteína G, Gαi2 y Gαo, en el BOA alinean a la suricata con el grupo de mamíferos que han perdido la expresión de la familia de receptores V2R. En el BOP, los patrones de expresión para ambas proteínas G coinciden con los observados en el ratón y en otros mamíferos. Presenta una expresión ubicua de Gαo en prácticamente todos los glomérulos y las capas profundas del BOP y la ausencia de inmunomarcaje anti-Gαi2 (Wekesa & Anholt, 1999; Salazar *et al*., 2016).

OMP es un marcador específico de las neuronas originadas en los neuroepitelios olfativos y vomeronasales que alcanzan las capas superficiales del bulbo olfativo (Bock *et al*., 2009). En la suricata adulta, el inmunomarcaje con OMP se restringió a los estratos nervioso y glomerular del BO, mostrando una expresión ligeramente más débil en el BOA respecto al BOP. Este patrón ha sido reportando de forma similar en lepóridos (Villamayor *et al*., 2020), didélfidos (Shnayder *et al*., 1993) y cánidos (Ortiz-Leal *et al*., 2021). El GAP-43 es un marcador muy útil para discriminar entre los axones maduros y las fibras nerviosas en regeneración. Esto se debe

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

a que la expresión de GAP-43 en las fibras recién formadas disminuye rápidamente después de que las fibras alcancen sus objetivos postsinápticos. Por tanto, se cree que GAP-43 está asociado a los procesos de crecimiento de las neuritas y de plasticidad sináptica (Verhaagen *et al*., 1989; Ramakers *et al*., 1992). El sistema olfativo es una región del sistema nervioso adulto que continúa mostrando una extensa plasticidad sináptica, por lo tanto, la identificación de altos niveles de expresión de GAP-43 en el BO de la suricata no fue un hallazgo inaudito. De hecho, se asemeja a las observaciones reportadas para otros mamíferos, tales como el ratón (Salazar *et al*., 2006) y el conejo (Villamayor *et al*., 2020).

Se emplearon los marcadores MAP-2 (Microtubule Associated Protein 2) y SMI-32 (Neurofilament Protein Marker 32) para caracterizar las células principales del BO. La proteína MAP-2 es un componente principal de los puentes de unión de microtúbulos en las dendritas. Por este motivo, resulta útil como marcador de los árboles dendríticos de las células mitrales/principales (Dehmelt & Halpain, 2005). En la suricata, el marcador MAP-2 se detectó principalmente en la capa mitral plexiforme y en el estrato granular del BOA, presentándose con un denso marcaje de pequeños somas neuronales. Estos resultados coinciden con el patrón descrito en el BO del conejo (Villamayor *et al*., 2020). El marcador SMI-32 tiñe principalmente los cuerpos celulares neuronales y las dendritas (Lee *et al*., 1988). En el BO de la suricata, el inmunomarcaje con SMI-32 se observó en el BOP, presentando una tinción intensa de los somas y prolongaciones de las células principales de las capas mitral y plexiforme. Esto resultó similar al patrón observado en otros mamíferos, tales como los ratones (Galliano *et al*., 2021) y los pangolines (Imam *et al*., 2018). Por el contrario, los monotremas no muestran marcaje de SMI-32 en su BOP (Ashwell, 2006). Respecto al inmunomarcaje de SMI-32 en el BOA de la suricata, no se observó una tinción apreciable, lo que coincide con el patrón descrito en pangolines (Imam *et al*., 2018).

El marcador de células gliales (GFAP) mostró un elevado nivel de expresión en el BO de la suricata, sugiriendo la presencia de interacciones neuronales-gliales activas. Estas interacciones están implicadas en la comunicación sináptica, la plasticidad y el control dinámico de la función cerebral en el cerebro adulto (Allen & Lyons, 2018). En el BOP, el inmunomarcaje con GFAP se concentró en las capas superficiales, mientras que en el BOA, los procesos gliales se extendieron por toda la estructura y se observó la tinción en astrocitos de la capa mitral plexiforme. El marcador GFAP también puede utilizarse tanto en mamíferos como en otros vertebrados para identificar la glía envolvente que mieliniza las fibras nerviosas de la capa nerviosa del BOA (Lazzari *et al*., 2016; Smithson & Kawaja, 2009). La densidad de cuerpos celulares y de procesos teñidos con GFAP en las capas nerviosa, glomerular y mitral plexiforme del BOA en la suricata contrasta con el número limitado de astrocitos identificados en el BOA del perro (Salazar *et al*., 1994). Así pues, el patrón obtenido se asemeja más al denso marcaje observado en el BOA de la rata (Bailey & Shipley, 1993), del ualabí (Torres *et al*., 2022a) o del zorro (Ortiz-Leal *et al*., 2021).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Las proteínas ligantes de calcio son sustancias neuroactivas que se expresan en grandes cantidades en el BO, y que a menudo se utilizan para identificar poblaciones neuronales

segregadas y así permitir la distinción neuroquímica de los diferentes tipos neuronales. En el estrato nervioso del BOA de la suricata, las fibras vomeronasales fueron completamente inmunopositivas tanto para la calbindina (CB) como para la calretinina (CR), produciendo una fuerte tinción en el neuropilo de todos los glomérulos. Sin embargo, las células periglomerulares (CPg) no fueron marcadas ni con anti-CR ni con anti-CB, lo que puede estar relacionado con el bajo número de CPg encontradas en la tinción de Nissl.

Las células principales del BOA no mostraron inmunotinción para ninguna de las dos proteínas fijadoras de calcio, CB y CR, de forma similar a lo observado en la zarigüeya (Jia & Halpern, 2004), el ratón (Kishimoto *et al*., 1993), la rata (Jacobowitz & Winsky, 1991) y el perro salvaje africano. Cabe mencionar que en el BOA de esta última especie sólo se estudió la expresión de CR (Chengetanai *et al*., 2020). En general, el patrón de tinción producido por la anti-CR en el BOA de la suricata fue similar a los resultados observados en la rata (Jacobowitz & Winsky, 1991), la zarigüeya (Jia & Halpern, 2004) y el perro salvaje africano (Chengetanai *et al*., 2020). Sin embargo, el pangolín muestra una mayor densidad de elementos celulares y fibras, especialmente en la capa granular (Imam *et al*., 2018). El marcaje con anti-CB observado en las capas superficiales del BOA de la suricata reveló diferencias más significativas entre especies que el marcaje con la anti-CR. En ratas (Porteros *et al*., 1995) y zarigüeyas (Jia & Halpern, 2004; Jia & Halpern, 2003), el neurópilo se tiñó con mucha menor intensidad que en la suricata. Asimismo, tanto en ratas como en zarigüeyas, algunos glomérulos individuales del BOA se tiñeron fuertemente y se mostraron delimitados por CPg aisladas teñidas positivamente.

El patrón de inmunotinción producido por la CR en los glomérulos del BOP (Torres *et al*., 2022b; Fig. 11) reveló una llamativa e intensa inmunotinción de las CPg. Sin embargo, en el neuropilo, la intensidad de la tinción de anti-CR fue muy débil, salvo en una subpoblación aislada de glomérulos independientes entre sí, situados en las proximidades del BOA, los cuales mostraron una fuerte inmunotinción. Basándonos en su localización, estos glomérulos atípicos podrían estar implicados en el procesamiento de las señales químicas procedentes del nervio vomeronasal, tal como se ha hipotetizado para los glomérulos del limbo olfativo en el ratón (Larriva-Sahd, 2012) y en el zorro (Ortiz-Leal *et al*., 2023). La presencia de glomérulos atípicos en el BOP no es un hallazgo novedoso, ya que se han descrito algunos ejemplos en el pasado, tales como el complejo glomerular "en collar" de los ratones (Shinoda *et al*., 1993) o el subconjunto de glomérulos con alta reactividad a la acetilcolinesterasa (Zheng *et al*., 1987). Hasta donde sabemos, esta es la primera vez que se caracteriza un complejo glomerular atípico empleando proteínas ligantes de calcio. Aunque estudios del marcaje de la CR en zarigüeyas (Jia & Halpern, 2004) y perros salvajes africanos (Chengetanai *et al*., 2020) han identificado subpoblaciones de glomérulos inmunopositivos en el BOP, no proporcionaron información sobre la relación topográfica de estas estructuras glomerulares con el BOA. La presencia de esta organización atípica en la proximidad del BOA en la suricata sugiere que la integración de la información del OVN es más compleja de lo que se pensaba, y puede implicar estructuras más allá del BOA.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Además de un patrón glomerular atípico, el BOP de la suricata muestra una densidad general de elementos reactivos teñidos con la anti-CB y la anti-CR más baja que el perro doméstico. De hecho, el perro es una especie que muestra una densidad muy alta de estos elementos, especialmente en respuesta al inmunomarcaje de CR. Sin embargo, el perro salvaje africano muestra una menor densidad de marcaje en las capas superficiales del BOP, que fueron las únicas capas descritas por Chengetanai *et al*. en su estudio del sistema olfativo del perro salvaje africano (Chengetanai *et al*., 2020). Un estudio morfométrico del BOP del perro (Choi *et al*., 2010) mostró una notable disminución de la densidad de marcaje con el aumento de la edad, especialmente con la CB. Esto podría explicar las diferencias en los patrones de marcaje reportadas para la expresión de CB en perros domésticos, perros salvajes africanos y suricatas. El BOP del pangolín muestra un patrón de expresión de CB y CR similar al de la suricata, caracterizado por una elevada densidad de CPg positivas para ambos marcadores y una ligera positividad en las células mitrales con la CR. Sin embargo, en la capa granular, la intensidad del marcaje es mayor en el pangolín, especialmente con la CB (Imam *et al*., 2018).

En cuanto al patrón de expresión de lectinas en el BO del suricata, estudiamos el marcaje histoquímico de tres lectinas. La importancia funcional de los grupos de azúcares detectados por las lectinas es elevada, ya que estos carbohidratos están implicados en el crecimiento de las neuritas, la plasticidad sináptica, la transducción de señales y las interacciones célula-célula (Kinzinger *et al*., 2005). La expresión de glicoconjugados en el BO es muy heterogénea y específica de cada especie, existiendo diferencias incluso entre especies estrechamente relacionadas. Por lo tanto, como han indicado estudios anteriores, la histoquímica de lectinas es una opción útil para la caracterización específica del SVN, capaz incluso de discriminar entre las zonas anteriores y posteriores del BOA (Torres *et al*., 2022a). Por tanto, resulta una valoración que debe considerarse al caracterizar la organización del BOA.

La lectina del tojo, UEA (*Ulex europaeus*), ha sido empleada como un marcador específico de la vía vomeronasal global (OVN, nervios vomeronasales y BOA) en ratones adultos (Kondoh *et al*., 2018; Salazar *et al*., 2001). Asimismo, la lectina BSI-B_4 (*Bandeiraea simplicifolia* agglutinin; Isolectin B_4) es reconocida como un excelente marcador específico del SVN tanto en ratas (Salazar & Sánchez-Quinteiro, 1998) como en zarigüeyas (Shapiro *et al*., 1995). A pesar de dichos antecedentes, la UEA no produjo ningún marcaje positivo en el BO de la suricata. Sin embargo, se ha descrito un patrón de tinción negativo similar en ovejas (Salazar *et al*., 2000), conejos (Villamayor *et al*., 2020) y corzos (Park *et al*., 2014). Sin embargo, en las ratas (Salazar & Sánchez-Quinteiro, 1998) y los cerdos (Salazar *et al*., 2000), la UEA produce marcaje tanto en el sistema olfativo como en el SVN. Por otro lado, en las suricatas, la BSI-B_4 fue negativa tanto en el BOA como en el BOP, de forma similar al patrón descrito en conejos (Villamayor *et al*., 2020). En contraste, la lectina LEA (*Lycopersicon esculentum* agglutinin) tiñó las capas nerviosa y glomerular tanto en el BOA como en el BOP. Este patrón está muy conservado, y ha sido descrito en una amplia gama de especies, incluyendo el ratón (Salazar *et al*., 2001), el ualabí (Torres *et al*., 2022a), el zorro (Ortiz-Leal *et al*., 2021), el ciervo (Park *et al*., 2014), la oveja y el cerdo (Salazar *et al*., 2000). Estos resultados sugieren que los glicoconjugados están implicados en la organización de las vías olfativas primarias y

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

vomeronasales en la suricata. Sin embargo, la base detallada de sus patrones de expresión sigue manteniéndose poco explorada.

En resumen, nuestra exhaustiva caracterización morfológica tanto del BOP como del BOA en la suricata indica que esta especie muestra una organización neuroanatómica consistente con la de un mamífero macrosmático. En concreto, nuestros hallazgos en la SVZ del BO sugieren que esta especie podría ser un modelo interesante de cara al estudio de la neurogénesis adulta en mamíferos. Las características estructurales del BOA muestran un patrón intermedio entre los carnívoros más estudiados, los perros y los gatos. Neuroquímicamente, el BOA sigue el patrón de expresión de la proteína G típico de los carnívoros, caracterizado por la expresión única de la familia de receptores V1R. La organización del BOP y del BOA observada mediante el uso de otros marcadores inmunohistoquímicos reveló sutiles diferencias específicas de la especie. este es el caso de la presencia de glomérulos atípicos positivos para CR en el BOP, lo que pone de manifiesto la importancia de la comunicación química en esta especie.

Nuestras observaciones permiten establecer una base morfológica que debería contribuir a dilucidar con precisión las funciones que desempeñan el olfato y el SVN en esta especie emblemática. Asimismo, en futuros estudios anatómicos se debería incluir otras estructuras asociadas tanto al sistema olfativo como al SVN, tal como son el núcleo olfativo y la amígdala.

5.4 GACELA DAMA

La pérdida de hábitat, la caza excesiva, la competencia con el ganado y el cambio climático han comprometido gravemente la supervivencia de la gacela dama. Mantener una población sana y sostenible de especies amenazadas como ésta, ayuda a preservar la biodiversidad general y el equilibrio ecológico de los ecosistemas. Para ello, es crucial mejorar el bienestar y la reproductividad de las poblaciones de gacela dama mantenidas en cautiverio. La comunicación química que se establece entre individuos de la misma especie puede desempeñar un papel importante en su comportamiento reproductivo. Esta comunicación puede implicar el uso de feromonas, pues en diversos mamíferos, éstas desempeñan un papel decisivo en la atracción de la pareja, la selección y el comportamiento de apareamiento (Liberles, 2014). Por ejemplo, las hembras de ratón liberan feromonas que atraen a los machos y aumentan su actividad sexual (Fu *et al*., 2015), mientras que los machos de hámster liberan feromonas que estimulan la ovulación y la receptividad de las hembras (Richardson *et al*., 2004).

Aunque en la actualidad existe un amplio campo de aplicación de las feromonas bovinas (Rekwot *et al*., 2001; Landaeta-Hernández *et al*., 2023), su potencial aplicación en la reproducción de la gacela dama requiere la previa caracterización neuroanatómica y morfofuncional de su órgano vomeronasal, que se ha abordado por primera vez, a nuestro entender, en este trabajo. Dada la amplia y reconocida diversidad morfofuncional del sistema vomeronasal entre los diferentes mamíferos (Wysocki, 1979; Meisami & Bhatnagar, 1998; Smith *et al*., 2001; Smith *et al*., 2011), la siguiente discusión contextualizará los resultados

USC DE COMPOSTELA

obtenidos en el contexto de la variabilidad interespecífica del OVN de rumiantes y mamíferos en general. Esto nos permitirá obtener más información sobre la ecología, la evolución y la biología de la conservación de esta especie.

Habitualmente, los estudios del OVN adolecen en muchos casos de estar circunscritos a la parte central del órgano, ignorando los cambios que éste experimenta a lo largo de su eje rostro-caudal. Por el contrario, existe un escogido número de estudios que evalúan las modificaciones espaciales mediante la realización de cortes macroscópicos e histológicos seriados que permiten caracterizar los cambios anatómicos e histológicos más llamativos (Bertmar, 1981; Salazar *et al*., 1995; Salazar *et al*., 2003; Vedin *et al*., 2010; Torres *et al*., 2020; Ortiz-Leal *et al*., 2020; Kondoh *et al*., 2021; Tomiyasu *et al*., 2022). En el caso de la gacela dama, hemos ampliado este enfoque incluyendo un estudio que engloba, a lo largo de toda la extensión del órgano, las características inmunohistoquímicas y lectino-histoquímicas del conducto vomeronasal y de los nervios vomeronasales. Para ello, hemos dividido el OVN de rostral a caudal en 15 niveles, de los cuales el nivel 1 constituye el extremo rostral del órgano, y el nivel 15 el caudal.

La morfología externa del órgano vomeronasal viene definida por la forma de su cápsula externa. En la gacela dama es de naturaleza cartilaginosa, abarca todo el OVN y está topográficamente relacionado en su pared medial con el hueso vómer, características comunes a todos los rumiantes estudiados. Su forma es relativamente peculiar, ya que la conformación más típica en rumiantes es ovalada, siendo el eje mayor dorsoventral (Jacobs *et al*., 1981; Hart *et al*., 1988; Vedin *et al*., 2010; Park *et al*., 2014; Ibrahim *et al*., 2013), en cambio, en la gacela dama el eje latero-medial es el predominante. Asimismo, presenta variaciones notables a lo largo del eje rostro-caudal del órgano.

Cuando estas variaciones se comparan con las especies de rumiantes estudiadas en series histológicas completas, en concreto, vaca y oveja, se observa que, de las tres especies, la gacela dama es la que presenta una mayor variación morfológica, siendo superior a la observada en la vaca (Salazar *et al*., 2008) y más aún si se compara con el OVN de la oveja, que es muy homogéneo en toda su longitud (Salazar *et al*., 2007). Otra característica notable es la presencia de hendiduras en la pared lateral del cartílago que se adaptan al paso de vasos y nervios. Las tres especies presentan una amplia comunicación lateral en sus niveles más rostrales, mientras que en su parte central sólo la vaca presenta una amplia hendidura lateral, que no se observa en la oveja (Salazar *et al*., 2007, 2008). En el caso de la gacela dama, esta abertura es moderada y ventralmente, coincide con la formación de un receso que aloja al tronco principal del nervio nasal caudal.

Existen menos datos sobre cómo la forma en que el conducto vomeronasal se comunica con el medio externo, ya que determinarlo con exactitud requiere la realización de series histológicas y la descalcificación de las muestras. Nuestra observación en la gacela dama es consistente con la evidencia disponible para otros rumiantes bóvidos, como la vaca y la oveja (Salazar *et al*., 2007, 2008), y no bóvidos, como el alce (Vedin *et al*., 2010). En todos los casos el conducto vomeronasal se abre en el conducto incisivo, al que se incorpora por su cara medial,

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

compartiendo ambos la misma cápsula cartilaginosa. En cuanto a la papila incisiva, hemos encontrado en la gacela dama la presencia de una papila funcional. Este hallazgo tiene especial relevancia, ya que no es un rasgo común a todos los Antilopinae, careciendo de papila incisiva las tres especies de antílopes alcelafinos estudiadas por Hart *et al*. (1988).

El amplio estudio histológico seriado realizado también ha permitido determinar las diferencias existentes a lo largo del eje rostro-caudal del órgano en cuanto al revestimiento epitelial del conducto vomeronasal. Este componente tiene especial importancia ya que es en su epitelio medial donde se localizan las células neurorreceptoras responsables de la detección de semioquímicos (Dennis *et al*., 2004; Mombaerts, 2004). Por otro lado, en su epitelio respiratorio lateral se localizan las células productoras del moco necesario para el funcionamiento de la quimiorrecepción (Breipohl *et al*., 1979; Takami *et al*., 1995) y los factores de crecimiento moduladores del propio epitelio neurorreceptor (Getchell *et al*., 2002).

Rostralmente, coincidiendo con la confluencia del conducto vomeronasal con el conducto incisivo, el epitelio sensorial está constituido por un epitelio escamoso simple que en el siguiente nivel caudal ya ha sido reemplazado por un epitelio pseudoestratificado que comprende dos capas celulares, en su mayoría poliédricas con células receptoras menos numerosas y dispersas. En el nivel 3 las células de forma geométrica han sido sustituidas por células alargadas que representan una transición al epitelio receptor vomeronasal típico. Sólo en el nivel 5, el epitelio medial muestra por primera vez la morfología típica de un epitelio sensorial completamente desarrollado y a su vez el conducto vomeronasal muestra una forma de media luna. En los niveles 7-9, el conducto vomeronasal reduce su diámetro y su forma vuelve a ser circular, pero tres cuartas partes del revestimiento epitelial del conducto son de naturaleza neurorreceptora. Este epitelio sensorial presenta una clara distinción entre células neurorreceptoras, en la parte basal, y células sustentaculares, más apicales y con núcleos densos. Esta organización celular se conserva hasta el final del conducto, aunque hay un notable aumento en el desarrollo del parénquima y el tamaño del conducto en el nivel 10, el cual da paso bruscamente, en los niveles12-13, al abrupto final del mismo.

El epitelio respiratorio es más uniforme. Rostralmente escamoso, pronto es sustituido por dos capas de células redondeadas u ovales, con células superficiales dispersas con núcleos translúcidos que permanecen hasta el nivel 4. En el nivel 5 todavía se observan algunas células poliédricas con citoplasma translúcido en su zona apical, pero las características son en su mayoría típicas de un epitelio respiratorio. Este patrón se conservará hasta la extremidad caudal del conducto vomeronasal, incluso en las invaginaciones epiteliales más tempranas que, como dedos enguantados, dan origen al conducto.

Los notables cambios observados a lo largo de todo el órgano en la forma del lumen no han sido descritos previamente en otros rumiantes. En concreto, en el caso de la vaca, Adams (1986) describe la forma de media luna como la predominante, excepto en la parte anterior del órgano. Su descripción de la parte rostral con un epitelio estratificado cuboidal de células con citoplasma ligeramente teñido coincide con lo que hemos observado en la gacela dama.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Asimismo, su descripción, así como la de otros autores en vacas (Taniguchi & Mikami, 1985; Salazar *et al*., 2008; Jang *et al*., 2021) en cuanto a la organización del neuroepitelio en células basales, neurorreceptoras y sustentaculares, y la organización del epitelio respiratorio coincide con lo observado por nosotros. Esto también es comparable con lo observado en otros Bovinae como la cabra (Park *et al*., 2013), oveja (Kratzing, 1971; Salazar *et al*., 1998, 2000; Salazar *et al*., 2003; Salazar *et al*., 2007; Ibrahim *et al*., 2013; Ibrahim, 2018) y búfalo de agua (Emam *et al*., 2016), pero también con el resto de rumiantes estudiados, como la jirafa (Kondoh, *et al*., 2017), el reno (Bertmar, 1981), el alce (Vedin *et al*., 2010) y el corzo coreano (Park *et al*., 2014), lo que demuestra que estamos ante un patrón ampliamente conservado en la evolución de los rumiantes.

La bomba vascular, responsable de movilizar las feromonas desde el medio externo hasta las células sensoriales del OVN, es impulsada por movimientos vasomotores, que permiten aspirar sustancias estimulantes hacia el interior del órgano vomeronasal, así como expulsar activamente el contenido del conducto vomeronasal. Estos mecanismos son activados por fibras que discurren por el nervio nasopalatino y que provocan la constricción de los vasos sanguíneos dentro de la cápsula del OVN (Meredith & O'Connell, 1979). Tras la constricción, se reduce el volumen de sangre en el tejido cavernoso, lo que crea un diferencial de presión que expande el lumen del OVN y extrae líquido de la región que rodea la abertura del conducto (Meredith *et al*., 1980). Los estímulos entran en el órgano vomeronasal en solución a través de la corriente de moco que pasa hacia el conducto vomeronasal desde el conducto incisivo. Los estímulos vomeronasales funcionales deben ser moléculas solubles en dicha mucosidad o sustancias que se vuelven solubles cuando se unen a moléculas portadoras que pueden ser secretadas por las glándulas vomeronasales (Krishna *et al*., 1995).

El notable desarrollo del componente vascular del parénquima de la gacela dama es una característica ya presente en los niveles rostrales, en los que la parte lateral del parénquima está completamente ocupada por vasos sanguíneos. Al desplazarse caudalmente, los vasos se extienden hacia las zonas dorsal y ventral, y finalmente, en las secciones caudales, ocupan todo el parénquima, tal como hemos observado tanto en secciones transversales como horizontales. Este hecho es común a las especies de rumiantes en las que el elemento vascular ha sido más estudiado (Salazar *et al*., 1998, 2008; Vedin *et al*., 2010). La presencia de una vasculatura desarrollada en el extremo caudal del OVN es hipotéticamente necesaria para la formación de una potente presión negativa en esta zona caudal. Esto coincide con nuestra observación en la gacela dama de que el neuroepitelio vomeronasal permanece intacto caudalmente, incluso en las interdigitaciones caudales del conducto vomeronasal, las cuales surgen directamente de las glándulas vomeronasales de esa región. Este hecho no ha sido descrito anteriormente en otras especies, hasta nuestro conocimiento. Por lo tanto, para que las feromonas puedan acceder a los receptores situados en esta zona caudal, es necesaria una fuerte presión negativa a este nivel.

El acceso de las feromonas vendrá determinado no sólo por la acción de la bomba, sino también por las propiedades fisicoquímicas de las moléculas. Parece lógico suponer que se establece un gradiente de dispersión de las sustancias a lo largo del conducto, llegando a la extremidad

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

caudal sólo las sustancias más solubles en la secreción glandular y permaneciendo en la parte anterior las menos solubles. Parece coherente hipotetizar que la especificidad de los receptores vomeronasales a lo largo del conducto vomeronasal se adapta a la migración diferencial de la mezcla de sustancias a lo largo del conducto, del mismo modo que los compuestos se eluyen de forma específica a lo largo de una columna de cromatografía.

Los epitelios vomeronasales están recubiertos de un fluido mucoso producido por las glándulas del OVN, que es necesario para que el neuroepitelio detecte sustancias (Sankarganesh *et al*., 2022). Dado que contiene varias enzimas que pueden transformar la estructura de las moléculas y alterar la detección por parte de las neuronas receptoras, el moco influye en la discriminación olfativa (Nagashima & Touhara, 2010). Asimismo, el fluido mucoso consta de varias enzimas con propiedades antibacterianas y antioxidantes (Ding & Xie, 2015).

Las propiedades de los fluidos mucosos difieren entre las especies (Kondoh *et al*., 2020) y normalmente se han caracterizado empleando la tinción con azul Alcián (AA), que identifica los polisacáridos ácidos sintetizados y secretados por las glándulas, y la tinción con ácido periódico-Schiff (PAS), que detecta polisacáridos neutros. Los primeros estudios sobre las GV concluyeron que en todas las especies examinadas únicamente se secretaban compuestos neutros (Loo & Kanagasunteram, 1972; Cuschieri & Bannister, 1974; Oikawa *et al*., 1993, 1994; Salazar *et al*., 1996). Sus resultados reflejaron la positividad del tejido glandular al marcador PAS, mientras que el AA produjo un resultado negativo. Sin embargo, en 1997, Salazar y sus colaboradores mostraron por primera vez glándulas vomeronasales AA-positivas. Estos hallazgos se encontraron en el OVN de vaca y del caballo, que también mostraron glándulas PAS-positivas (Salazar *et al*., 1997b). Posteriormente, varios autores observaron ambos tipos de GV en todos los rumiantes estudiados: vaca (Salazar *et al*., 2008; Jang *et al*., 2021), oveja (Lombardero, 1997; Salazar *et al*., 2007), cabra (Yang *et al*., 2021), ciervo sika (Kondoh *et al*., 2020), jirafa (Kondoh, *et al*., 2017) y gacela dama (Abood & Hussein, 2018). El grado de desarrollo de las glándulas y la intensidad de la respuesta a ambas tinciones, PAS y AA, fue similar en todas las especies.

Nuestras observaciones en la gacela dama muestran una clara distinción entre los dos tipos de secreciones. El PAS produjo una tinción generalizada del componente glandular desde el nivel rostral 3 hasta el extremo caudal del OVN, mientras que el azul Alcián sólo tiñó la parte central del OVN (nivel 6) y la tinción se restringió a un pequeño grupo de glándulas en la parte dorsal del parénquima. Este resultado confirma que, para establecer comparaciones con otro grupo de animales, es aconsejable realizar estudios en todo el conjunto del OVN para así evitar cometer errores al extrapolar la información obtenida sólo en una zona concreta. Por ejemplo, esto puede explicar por qué un estudio inicial en musarañas almizcleras no encontró glándulas AA positivas (Oikawa *et al*., 1993) cuando sin embargo, recientemente se identificaron glándulas AA positivas en esa especie (Kondoh *et al*., 2020).

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Aunque la distribución de los dos componentes principales de la inervación del OVN, las fibras no mielinizadas del nervio vomeronasal y las fibras mielinizadas del nervio nasal caudal, han

recibido menos atención en los estudios del OVN de rumiantes, las observaciones realizadas en la gacela dama son comparables a las descritas en otras especies (Salazar *et al*., 1997b; Salazar *et al*., 2007; Vedin *et al*., 2010). Sin embargo, el estudio histológico seriado muestra una característica destacable. Desde los niveles más rostrales (3) está presente una inervación sensorial en la parte medial del parénquima, lo que significa que aunque la estructura del neuroepitelio en los niveles más rostrales está aún lejos de presentar la estructura estratificada y de la densidad de células receptoras observada en los niveles centrales, ya posee una inervación sensorial significativa.

Dadas las notables variaciones observadas en la estructura del conducto vomeronasal y su revestimiento epitelial, la expresión de los marcadores estudiados inmunohistoquímicamente no se realizó únicamente en la parte central del OVN, sino que se extendió a toda su longitud. Tal como hemos citado anteriormente, para caracterizar la expresión de las dos principales familias de receptores vomeronasales, V1R y V2R, respectivamente (Dulac & Axel, 1995; Ryba & Tirindelli, 1997), resultan especialmente útiles los anticuerpos específicos contra la subunidad α de las proteínas Gi2 y Go. La investigación de la expresión y distribución de la proteína G en el SVN de la cabra (Takigami, 2000) reveló, por primera vez, que la vía Go había desaparecido en algunas especies, un hallazgo que se confirmó posteriormente en numerosos mamíferos, incluyendo Laurasiatheria y Primates (Suárez *et al*., 2011). Sin embargo, se han observado discrepancias entre la secuenciación génica y los estudios inmunohistoquímicos, principalmente en el Orden Carnivora, donde Dennis *et al*. (2003) en el perro y Ortiz-Leal *et al*. (2020) en el zorro observaron marcaje positivo en el epitelio neurosensorial vomeronasal utilizando tanto anticuerpos anti-Gαi2 como anti-Gαo. Esto contrasta con la aparente ausencia de genes funcionales V2R en el genoma de ambas especies (Young & Trask, 2007; Kukekova *et al*., 2018). Sin embargo, es probable que los nuevos estudios de secuenciación, más centrados en los genes olfativos y vomeronasales den lugar a la identificación de genes adicionales que puedan añadirse al repertorio de genes vomeronasales identificados mediante un enfoque de genoma completo. De hecho, recientemente Kondoh *et al*. (2022) detectaron la presencia de genes V2R funcionales en el genoma de bovinos, caprinos, ovinos y porcinos mediante ensamblaje genómico.

Asimismo, muchos de los autores que observaron la desaparición de la vía Go limitaron su estudio de la expresión de Gαi2 y Gαo al BOA, primer centro integrador en el cerebro del SVN, sin realizar inmunohistoquímica en el propio OVN. Nuestro estudio en la gacela dama puede arrojar algo de luz sobre esta cuestión, ya que hemos observado inmunopositividad para ambos marcadores (Gαi2 y Gαo) en el epitelio vomeronasal. Por otra parte, al realizar un estudio inmunohistoquímico seriado a lo largo de todo el conducto vomeronasal, hemos podido confirmar que la expresión de ambos marcadores no es constante en el ES, ya que una parte significativa del mismo no muestra positividad ante ninguna de las dos proteínas. En concreto, el gran segmento que se extiende desde el nivel 9 al nivel 13, a pesar de tener un neuroepitelio bien caracterizado, carece de inmunomarcaje para ambas proteínas. Esto implica que el tipo de receptor expresado en este tercio caudal del conducto vomeronasal no corresponde ni a V1R ni a V2R, sugiriendo que las moléculas detectadas por estos dos tipos de receptores no alcanzan

USC

el extremo caudal del órgano. De ello se deduce que sólo compuestos altamente solubles en la mucosa vomeronasal y probablemente de bajo peso molecular pueden ser detectados en el OVN caudal, y probablemente por otro tipo de receptores aún no descritos. La ausencia de expresión de receptores vomeronasales en un tramo tan extenso del OVN podría explicar por qué los estudios previos de expresión de proteínas G en el OVN de rumiantes no han encontrado positividad para el marcador Gαo, como ha sido el caso de la cabra (Takigami, 2000), oveja (Salazar *et al*., 2007) y ciervo sika (Matsubara *et al*., 2019). La elección de un único nivel, generalmente el central, para estos estudios podría haber condicionado los resultados obtenidos.

Respecto a la discusión de la expresión de receptores Gαo/V2R, cabe destacar que Kondoh *et al*. (2022) en su estudio del BOA de la vaca no encontraron positividad para Gαo, como tampoco se encontró en el BOA del perro (Salazar *et al*., 2013) o zorro (Ortiz-Leal *et al*., 2022). En cambio, esto no excluye la expresión de receptores V2R en el OVN, ya que es plausible que la información de estos receptores pueda proyectarse a otras áreas del bulbo olfatorio, no necesariamente al BOA. De hecho, recientemente se ha observado en el bulbo olfativo del zorro que la expresión de Gαo ligada a los nervios vomeronasales no proyecta al BOA, sino a la zona de transición situada entre el bulbo olfatorio principal y el accesorio, área conocida como limbo olfatorio (Ortiz-Leal *et al*., 2023).

La madurez neuronal del neuroepitelio del OVN en la gacela dama se analizó con anti-OMP, marcador ampliamente utilizado para el estudio de la mucosa olfatoria y del OVN (Smith *et al*., 2011; Sasuga *et al*., 2013; Rodewald *et al*., 2016). Las propiedades funcionales del OMP siguen siendo objeto de debate. Se ha demostrado que desempeña un papel en la maduración de las neuronas olfativas y en el nivel de selectividad en el estímulo-respuesta (Buiakova *et al*., 1996).

En la gacela dama el anti-OMP produjo un marcaje positivo en el ES a niveles rostrales y centrales del OVN, pero no tiñó los niveles caudales 10-13 como igualmente ocurrió con las proteínas G. El anti-OMP tiñó más intensamente los cuerpos celulares que las dendritas en las células receptoras positivas. Esta característica también se encontró en ovejas (Ibrahim, 2018), vacas (Jang *et al*., 2021) y corzos (Shin *et al*., 2017), sin embargo, la cabra mostró el patrón inverso (Park *et al*., 2013; Yang *et al*., 2021). El inmunomarcaje con anti-OMP en el ER muestra variaciones entre los diferentes rumiantes. Mientras que la oveja no muestra marcaje OMP positivo en su ER (Salazar *et al*., 2007), el corzo tiene células ciliadas y basales OMP positivas (Shin *et al*., 2017). Por su parte, la gacela dama muestra un patrón intermedio, con un marcaje difuso y unas pocas células ciliadas OMP positivas en su ER. Del mismo modo, tanto la vaca como la cabra negra coreana mostraron este patrón intermedio (Park *et al*., 2013; Yang *et al*., 2021).

Para comprender mejor las propiedades neuroquímicas del neuroepitelio vomeronasal, hicimos uso de una gama adicional de marcadores neuronales. Producto génico de proteína 9.5 (PGP 9.5) es un biomarcador neuronal expresado en paraneuronas sensoriales que desempeña un papel vital en la regulación de la ubiquitina. Se ha encontrado expresado en células receptoras olfativas, células de papilas gustativas y células ciliadas vestibulares (Iwanaga *et al*., 1992;

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Johnson *et al*., 1994). Los resultados que obtuvimos en la gacela dama concuerdan con los observados en ovejas (Ibrahim, 2018), vacas (Jang *et al*., 2021), corzos asiáticos (Park *et al*., 2014) y cabras negras coreanas (Park *et al*., 2013). Las células PGP 9.5-positivas muestran una fuerte inmunorreactividad en su soma, dendritas y sus axones, que se extienden a través de la lámina. Asimismo, se observan algunas células ciliadas PGP 9.5-positivas en el ER, como sucede en todos los rumiantes mencionados excepto las ovejas.

De acuerdo con los hallazgos de nuestra investigación, realizada a lo largo del eje rostro-caudal del OVN, la expresión de PGP 9.5 puede encontrarse en la zona del epitelio sensorial caudal (niveles 10-13), a pesar de que allí no se expresan ni las proteínas G analizadas ni el marcador OMP. Por un lado, este hallazgo proporciona pruebas de que la naturaleza neuroepitelial histológicamente descrita de este largo tramo de epitelio medial es correcta. Por otra parte, sugiere que el tipo de receptores que se expresan difiere de los que pertenecen a las familias V1R y V2R.

La enolasa neuronal específica (EN), una isoenzima cerebral específica de la enzima glicolítica enolasa, que se caracteriza por su presencia constante en el citoplasma de las neuronas maduras (Iwanaga *et al*., 1989), incluidas las neuronas sensoriales. Hasta donde sabemos, no existen estudios inmunohistoquímicos realizados con este marcador en rumiantes. Nuestras observaciones en la gacela dama no sólo confirman el inmunomarcaje obtenido en una amplia variedad de órdenes de mamíferos, incluyendo roedores e incluso humanos (Takami *et al*., 1993; Wang *et al*., 1994). Sino que también extienden la inmunopositividad a todo el epitelio sensorial, confirmando los resultados obtenidos con PGP 9.5 en cuanto a la naturaleza neurosensorial del tercio caudal del conducto vomeronasal.

Las proteínas ligantes de calcio desempeñan en las células receptoras vomeronasales un papel en la modulación de la señalización del calcio y, por ende, en la transmisión de la información sensorial. Aunque se ha identificado su presencia en el OVN de una muy amplia gama de grupos de mamíferos, algunos ya discutidos en esta tesis, que incluyen Rodentia (Kishimoto *et al*., 1993; Jia & Halpern, 2003; Torres *et al*., 2020), Marsupialia (Jia & Halpern, 2004; Torres *et al*., 2022a), Canidae (Ortiz-Leal *et al*., 2020), Soricidae (Malz *et al*., 2000) y Hominidae (Johnson *et al*., 1994), no se dispone de información sobre este grupo de proteínas en el OVN de rumiantes. Mediante el estudio de cuatro de ellas -calbindina, calretinina, parvalbúmina y secretagoguina- hemos podido colmar una laguna importante en el estudio de la neuroquímica del órgano vomeronasal en un grupo tan amplio de mamíferos. En el caso concreto de la secretagoguina, se trata de la primera descripción de la expresión de este neuropéptido, recientemente descubierto (Wagner *et al*., 2000) en el OVN de los mamíferos. De los cuatro marcadores utilizados, la calbindina y la calretinina han producido los mejores resultados en la caracterización de los elementos estructurales que forman el epitelio neurorreceptor del OVN, ya que la expresión de secretagoguina y parvalbúmina fue común en los epitelios sensoriales y respiratorios. Como ocurre en el ratón, la anti-parvalbúmina tiñó el OVN de la gacela dama de forma moderada y menos intensa que la CB o la CR (Kishimoto *et al*., 1993).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Ambos anticuerpos contra CB y CR tiñeron una subpoblación de neuronas receptoras vomeronasales en el conducto vomeronasal de la gacela dama. Los somas de las neuronas inmunorreactivas estaban localizados en la región basal y media del epitelio sensorial del OVN, lo que contrasta con la posición apical de los somas CB en el OVN de la rata (Jia & Halpern, 2003). Las dendritas apicales gruesas, los somas piriformes y los axones se tiñeron claramente con ambos marcadores en la gacela dama. Asimismo, se observaron axones positivos a la CB y la CR en los haces nerviosos de la lámina propia y en los nervios vomeronasales. Este patrón de inmunomarcaje empezó a hacerse visible en el epitelio sensitivo (ES) en los niveles rostrales L3-L4, y, de forma gradual, se generalizó desde el nivel L5 al L9. Sin embargo, al igual que en el caso de las proteínas G y del OMP, la expresión de las proteínas de unión al calcio no se produjo en la zona caudal del epitelio sensorial.

El estudio inmunohistoquímico se completó con una caracterización específica del tejido epitelial utilizando el anticuerpo anti-citoqueratina 8, una proteína de filamentos intermedios de tipo II (Franke *et al*., 1981). En la gacela dama, el anti-CYK8 identificó células neurorreceptoras y células sustentaculares a través de los epitelios sensorial y respiratorio de forma amplia. Sin embargo, en los niveles anteriores del OVN, el anti-CYK8 no produjo un marcaje homogéneo, al no teñirse las células poligonales apicales. El significado funcional de estas células permanece desconocido, ya que no pudimos encontrar ninguna referencia en la literatura del OVN. La mayoría de las investigaciones sobre citoqueratinas en el OVN se han realizado utilizando cócteles de citoqueratinas, lo cual dificulta comparar los resultados. Dennis *et al*. (2003) encontraron en perros que el inmunomarcaje estaba restringido a las células basales, mientras que Poran (1998) encontró en la zarigüeya un patrón más difuso, similar al que observamos en la gacela dama, aunque con mayor intensidad en el RE que en el SE.

Dado que la superficie luminal del conducto vomeronasal está cubierta por una capa de glicocálix, que es una capa de carbohidratos y proteínas, la utilización de las lectinas resulta particularmente útil en la investigación del sistema vomeronasal (Plendl & Sinowatz, 1998; Brooks, 2023). Asimismo, las lectinas se utilizan para identificar y marcar las células sensoriales, el epitelio respiratorio y el componente glandular del OVN (Halpern *et al*., 1998). Si nos limitamos al tejido nervioso, es notable cómo ciertas lectinas son exclusivas de la vía vomeronasal. Estas lectinas reconocen la célula neurorreceptora global, no solo a nivel de sus dendritas y somas, sino también de sus axones, hasta sus proyecciones terminales en el BOA (Salazar *et al*., 1994; Kondoh *et al*., 2017; Kondoh *et al*., 2018; Chun *et al*., 2023). Sin embargo, cualquier estudio del sistema vomeronasal basado en el uso de lectinas debe tener en cuenta que los patrones de marcaje son altamente específicos, con notables diferencias incluso entre especies tan cercanas filogenéticamente como la rata (Salazar & Sánchez Quinteiro, 1998) y el ratón (Salazar *et al*., 2001). Por este motivo, deben evitarse las extrapolaciones.

En nuestra investigación sobre el OVN de la gacela dama, hemos empleado cinco lectinas para revelar los patrones de unión de los glicoconjugados tanto en el epitelio sensorial vomeronasal como en el respiratorio, los nervios vomeronasales y las glándulas. Todas las lectinas empleadas tiñeron tanto las GV como el complejo muco-microvillar, que cubre la superficie luminal de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ambos epitelios vomeronasales. Asimismo, cada lectina tiñó específicamente diferentes estructuras del OVN y mostró sus propios patrones de localización e intensidad de marcaje. La lectina SBA (*Glycine max*) produjo un marcado intenso en el tejido glandular a lo largo de todo el OVN, desde su extremo rostral. Del mismo modo, la VVA (*Vicia villosa*) tiñó las GV en la parte central del OVN, pero con menor intensidad que la SBA. Ni la SBA ni la VVA tiñeron los epitelios ni los axones del nervio vomeronasal. Las lectinas LEA (*Lycopersicon esculentum*) y STA (*Solanum tuberosum*) marcaron fuertemente el epitelio vomeronasal, las GV y los nervios vomeronasales, mientras que el nervio nasal caudal permaneció sin teñir. En cuanto a la lectina UEA (*Ulex europaeus*), su marcaje se concentra en el epitelio vomeronasal y en las GV, pero no tiñe los nervios vomeronasales del parénquima del OVN. En contraste con las proteínas detectadas en el estudio inmunohistoquímico, no se observaron diferencias notables en el patrón de marcaje de las lectinas empleadas a lo largo del eje rostro-caudal del OVN.

Estos resultados muestran diferencias y similitudes con el marcaje obtenido por estas lectinas en el OVN de otras especies de mamíferos rumiantes. Por esta razón, nuestros hallazgos se relacionan a continuación con la información existente sobre oveja (*Ovis orientalis aries*) (Salazar *et al*., 2000, 2007; Ibrahim *et al*., 2013), vaca (*Bos taurus coreanae*) (Jang *et al*., 2021), cabra (*Capra aegagrus hircus*) (Park *et al*., 2013; Yang *et al*., 2021) y corzo asiático (*Capreolus pygargus*) (Park *et al*., 2014; Shin *et al*., 2017).

La lectina SBA produjo un marcaje análogo en gacela dama y oveja (Ibrahim, 2018), al teñirse únicamente las GV el borde luminal del epitelio vomeronasal. Por otra parte, el mismo marcador tiñó moderadamente el ES vomeronasal en especies de rumiantes como la vaca (Jang *et al*., 2021), la cabra (Park *et al*., 2013; Yang *et al*., 2021) y el corzo (Park *et al*., 2014). De hecho, en vacas también tiñe de forma moderada los nervios vomeronasales (Jang *et al*., 2021).

De igual modo, la lectina VVA marcó exclusivamente el borde superficial del epitelio y las GV en la gacela dama, aunque con menor intensidad que la SBA. En cambio, el marcaje de esta lectina se extiende moderadamente al epitelio vomeronasal y a los NVN en la vaca (Jang *et al*., 2021), y en menor medida, en la oveja (Ibrahim *et al*., 2013).

La lectina LEA tiñó numerosas estructuras vomeronasales en la gacela dama, tales como el borde epitelial vomeronasal, el epitelio vomeronasal, las GV y los NVN. Esto también sucede en la vaca, la oveja y el corzo, donde la LEA tiñe las mismas estructuras de una forma similar (Salazar *et al*., 2000; Ibrahim *et al*., 2013; Shin *et al*., 2017; Jang *et al*., 2021).

Curiosamente, la lectina STA sigue exactamente el mismo patrón que LEA., marcando el borde luminal, el epitelio vomeronasal, las GV y los NVN tanto en la gacela dama, como en el corzo y la vaca (Shin *et al*., 2017; Jang *et al*., 2021).

Por último, el marcaje de la lectina UEA se limitó al borde luminal, el epitelio vomeronasal y las GV. Este patrón se repite en otros rumiantes, tales como la oveja, la cabra, el corzo y la vaca, aunque de forma tenue (Salazar *et al*., 2000; Ibrahim *et al*., 2013; Park *et al*., 2013; Shin

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

et al., 2017; Jang *et al*., 2021). Asimismo, la UEA también marca los NVN en la vaca (Jang *et al*., 2021).

En resumen, nuestro estudio ha contribuido a llenar el vacío existente en el conocimiento del órgano vomeronasal en especies de rumiantes salvajes, que son un grupo de animales para los que se dispone de poca información sobre la organización histológica y neuroquímica de su sistema vomeronasal. Al investigar el órgano vomeronasal de la gacela dama, hemos obtenido información valiosa sobre la conformación y función de esta estructura sensorial crítica en esta especie amenazada. Además, al tratarse de una especie amenazada, la información obtenida en nuestro estudio podría utilizarse para diseñar y aplicar programas basados en el empleo de feromonas para mejorar el éxito reproductivo y aumentar la diversidad genética en las poblaciones cautivas. Tales programas pueden ser críticos para la supervivencia de la especie, y nuestro trabajo ha proporcionado una sólida base morfológica para futuras investigaciones sobre este tema.

Por último, nuestra investigación también ha supuesto una contribución significativa al estudio general del órgano vomeronasal. Al realizar un análisis histológico e inmunohistoquímico exhaustivo del OVN, hemos identificado diferencias notables en la organización del conducto vomeronasal y la expresión de marcadores neuronales a lo largo del eje rostro-caudal del órgano. Estos hallazgos evidencian la importancia de tener en cuenta tales diferencias al realizar futuros estudios sobre el OVN en otras especies. En general, nuestro estudio subraya el papel fundamental que desempeña el órgano vomeronasal en la mediación de los comportamientos sociales y reproductivos en la gacela dama, y destaca la necesidad de seguir investigando de cara a comprender mejor esta estructura sensorial única, tanto en la gacela dama como en otras especies de rumiantes salvajes.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6 CONCLUSIONES

1. Las cuatro especies investigadas, representantes de los órdenes Rodentia, Dipropodontia, Carnívora y Artiodáctila, poseen un SVN funcional, desarrollado y con características propias. De hecho, tanto el grado de diferenciación morfológica como el grado de diversidad histoquímica y neuroquímica han sido notables en cada una de las especies.

2. Las marcadas diferencias que se observaron entre los distintos modelos de SVN evaluados, tanto a nivel morfológico como histoquímico e inmunohistoquímico, refuerzan la idea de que no se debe extrapolar información entre diferentes especies.

3. La madurez del SVN en el periodo neonatal fue evaluada en el capibara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), que mostró un SVN, tanto a nivel de OVN como de BOA, morfológicamente comparable al que presenta en la edad adulta, con glándulas vomeronasales activas y la misma reactividad frente a la mayoría de los marcadores histoquímicos e inmunohistoquímicos empleados, tales como el OMP, marcador específico de células olfativas maduras. Sobre la base de estos hallazgos, se puede extraer la conclusión general de que el SVN del capibara recién nacido ya es capaz de establecer funciones similares a las que desempeña en el animal adulto y abre la puerta a la existencia de una posible comunicación funcional con la madre durante la vida prenatal.

4. El SVN de los roedores domésticos no debe emplearse como modelo general entre los mamíferos, ya que incluso entre los roedores salvajes y domésticos existen muy notables diferencias.

5. El ualabí de Bennet (*Notamacropus rufogriseus*) pertenece al grupo de especies con modelo segregado del SVN, debido a que expresa las dos familias de receptores vomeronasales (V1R y V2R). Por lo tanto, no se sustenta la existencia de un tercer tipo intermedio de procesamiento de la información vomeronasal en macropódidos.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6. La suricata (*Suricata suricatta*) únicamente expresa receptores de la familia V1R en su BOA, por lo que se confirma el deterioro de la familia de receptores V2R y la ubicación de los Herpéstidos en el grupo de especies con un modelo uniforme de SVN.

7. La suricata (*Suricata suricatta*) posee un BO morfofuncionalmente más afín al que presentan los félidos respecto al de los cánidos. Resultados que van en consonancia con la actual organización taxonómica de esta especie, incluida en el suborden Feliformia.

8. El estudio histológico e inmunohistoquímico a lo largo del eje rostro-caudal del OVN en la gacela dama (*Nanger dama*), ha permitido identificar diferencias notables en la organización del conducto vomeronasal y la expresión de neuromarcadores. Teniendo en cuenta estos hallazgos, basar un estudio sobre el OVN en una única zona, habitualmente la parte central, puede llevar a conclusiones erróneas. Por lo tanto, deben de considerarse tales diferencias al realizar futuros estudios del OVN en otras especies.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7 BIBLIOGRAFÍA

1. **Abood DA, Hussein ZM (2018)** Histological and Histochemical Features for Jacobson's Glands in Male *Gazella subgutturosa*. *Indian J Nat Sciences*. **8**(46): 13107-13114.

2. **Acree F, Turner RB, Gouck HK, Beroza M, Smith N (1968)** L-lactic acid: a mosquito attractant isolated from humans. *Science* **161**: 1346-1347. https://doi.org/10.1126/science.161.3848.1346

3. **Adams DR (1986)** The bovine vomeronasal organ. *Arch Histol Jpn*. **49**(2): 211-225. https://doi.org/10.1679/aohc.49.211

4. **Andressen C, Blümcke I, Celio MR (1993)** Calcium-binding proteins: selective markers of nerve cells. *Cell Tissue Res*. **271**(2): 181-208. https://doi.org/10.1007/BF00318606

5. **Aland RC, Gosden E, Bradley AJ (2016)** Seasonal morphometry of the vomeronasal organ in the marsupial mouse, *Antechinus subtropicus*. *J Morphol.* **277**(11): 1517-1530. https://doi.org/10.1002/jmor.20593

6. **Albeanu DF, Provost AC, Agarwal P, Soucy ER, Zak JD, Murthy VN (2018)** Olfactory marker protein (OMP) regulates formation and refinement of the olfactory glomerular map. *Nat Commun*. **9**(1): 1-12. https://doi.org/10.1038/s41467-018-07544-9

7. **Aleksiuk M (1968)** Scent-mound communication, territoriality, and population regulation in beaver (*Castor canadensis kuhl*). *J Mammal.* **49**: 759-762. https://doi.org/10.2307/1378741

8. **Allen NJ, Lyons DA (2018)** Glia as architects of central nervous system formation and function. *Science*. **362**: 181–185. https://doi.org/10.1126/science.aat0473

9. **Allison AC (1953)** The structure of the olfactory bulb and its relationship to the olfactory pathways in the rabbit and the rat. *J Comp Neurol*. **98**(2): 309-353. https://doi.org/10.1002/cne.900980206

10. **Alonso JR, Porteros A, Crespo C, Arévalo R, Briñón JG, Weruaga E, Aijón J (1998)** Chemical anatomy of the macaque monkey olfactory bulb: NADPH-diaphorase/nitric oxide

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

synthase activity. *J Comp Neurol*. **402**: 419–434. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19981221)402:3<419::AID-CNE9>3.0.CO;2-C

11. **Alonso JR, Briñón JG, Crespo C, Bravo IG, Arévalo R, Aijón J (2001)** Chemical organization of the macaque monkey olfactory bulb: II. Calretinin, calbindin D-28k, parvalbumin, and neurocalcin immunoreactivity. *J Comp Neurol*. **432**(3): 389-407. https://doi.org/10.1002/cne.1110

12. **Alroy J, Ucci AA, Goyal V, Woods W (1986)** Lectin histochemistry of glycolipid storage diseases on frozen and paraffin-embedded tissue sections. *J Histochem Cytochem*. **34**: 501–505. https://doi.org/10.1177/34.4.3081625

13. **Altmann D, Sorensen L (1987)** Zoo Behaviour Science in the Research Centre for Vertebrate Studies of the Academy of Sciences of the German Democratic Republic (in the Animal Park of Berlin). *Appl Anim Behav Sci.* **18**: 67-81. https://doi.org/10.1016/0168-1591(87)90255-3

14. **Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM (2002)** Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci*. **22**: 629–634. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-03-00629.2002

15. **Apfelbach R, Blanchard CD, Blanchard RJ, Hayes RA, McGregor IS (2005)** The effects of predator odors in mammalian prey species: a review of field and laboratory studies. *Neurosci Biobehav Rev.* **29**: 1123-44. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.05.005

16. **Apps PJ, Weldon PJ, Kramer M (2015)** Chemical signals in terrestrial vertebrates: search for design features. *Nat Prod Rep.* **32**: 1131-1153. https://doi.org/10.1039/C5NP00029G

17. **Archer C, Garcia A, Henderson M, McGlone JJ (2022)** Olfactory enrichment using a maternal pheromone improved post-weaning pig performance and behavior. *Front Vet Sci*. **9**: 965370. https://doi.org/10.3389/fvets.2022.965370

18. **Arimura G, Ozawa R, Kugimiya S, Takabayashi J, Bohlmann J (2004)** Herbivore-Induced Defense Response in a Model Legume. Two-Spotted Spider Mites Induce Emission of (E)- *β*-Ocimene and Transcript Accumulation of (E)- *β*-Ocimene Synthase in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* **135**: 1976–1983. https://doi.org/10.1104/pp.104.042929

19. **Ashwell KW (2006)** Chemoarchitecture of the monotreme olfactory bulb. *Brain Behav Evol*. **67**: 69–84. https://doi.org/10.1159/000089181

20. **Ashwell KW (2012)** Development of the olfactory pathways in platypus and echidna. *Brain Behav Evol.* **79**(1): 45-56. https://doi.org/10.1159/000332804

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

21. **Aviles-Rosa EO, Surowiec K, McGlone J (2020)** Identification of Faecal Maternal Semiochemicals in Swine (*Sus scrofa*) and their Effects on Weaned Piglets. *Sci Rep.* **10**: 5349. https://doi.org/10.1038/s41598-020-62280-9

22. **Ayelo PM, Pirk CWW, Yusuf AA, Chailleux A, Mohamed SA, Deletre E (2021)** Exploring the kairomone-based foraging behaviour of natural enemies to enhance biological control: A Review. *Front Ecol Evol.* **9**: 641974. https://doi.org/10.3389/fevo.2021.641974

23. **Bailey MS, Shipley MT (1993)** Astrocyte subtypes in the rat olfactory bulb: Morphological heterogeneity and differential laminar distribution. *J Comp Neurol*. **328**: 501–526. https://doi.org/10.1002/cne.903280405

24. **Baker H, Towle AC, Margolis FL (1988)** Differential afferent regulation of dopaminergic and GABAergic neurons in the mouse main olfactory bulb. *Brain Res.* **450**(1-2): 69-80. https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)91545-4

25. **Balogh C (1860)** Das Jacobson'sche Organ des Schafes:(vorgelegt in der Sitzung vom 3. November 1860).

26. **Barrios AW, Núñez G, Sánchez-Quinteiro P, Salazar I (2014)** Anatomy, histochemistry, and immunohistochemistry of the olfactory subsystems in mice. *Front Neuroanat.* **8**: 63. https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00063

27. **Bartecki U, Heymann EW (1990)** Field observations on scent-marking behaviour in saddle-back tamarins, *Saguinus fuscicollis* (Callitrichidae, Primates). *J. Zool.* **220**: 87-99. https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1990.tb04295.x

28. **Baum MJ, Kelliher KR (2009)** Complementary roles of the main and accessory olfactory systems in mammalian mate recognition. *Annu Rev Physiol.* **71**: 141–160. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4939-05.2006

29. **Beauchamp G, Doty R, Moulton DG, Mugford RA (1976)** The Pheromone Concept in Mammalian Chemical Communication: A Critique. *Mammalian Olfaction, Reproductive Processes, and Behavior:* 143-160. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-221250-5.50012-7

30. **Benowitz LI, Perrone-Bizzozero NI, Neve RL, Rodriguez W (1990)** GAP-43 as a marker for structural plasticity in the mature CNS. *Prog Brain Res*. **86**: 309-320. https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)63187-8

31. **Bertmar G (1981)** Variations in size and structure of vomeronasal organs in reindeer Rangifer tarandus tarandus l. *Arch Biol*. **92**(3): 343-366.

32. **Berüter J, Beauchamp GK, Muetterties EL (1973)** Complexity of chemical communication in mammals: urinary components mediating sex discrimination by male

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

guinea pigs. *Biochem Biophys Res Commun.* **53**: 264-271. https://doi.org/10.1016/0006-291X(73)91429-0

33. **Berüter J, Beauchamp GK, Muetterties EL (1974)** Mammalian chemical communication: perineal gland secretion of the guinea pig. *Physiol Zool.* **47**: 2. https://doi.org/10.1086/physzool.47.2.30155630

34. **Bhatnagar KP, Meisami E (1998)** Vomeronasal organ in bats and primates: extremes of structural variability and its phylogenetic implications. *Microsc Res Tech.* **43**(6): 465–475. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19981215)43:6<465::AID-JEMT1>3.0.CO;2-1

35. **Bhatnagar KP, Smith TD (2003)** The human vomeronasal organ. V. An interpretation of its discovery by Ruysch, Jacobson, or Kölliker, with an English translation of Kölliker (1877). *Anat Rec B New Anat.* **270B**: 4-15. https://doi.org/10.1002/ar.b.10001

36. **Blum MS (1996)** Semiochemical parsimony in the arthropoda. *Annu Rev Entomol.* **41**: 353-74. https://doi.org/10.1146/annurev.en.41.010196.002033

37. **Bock P, Rohn K, Beineke A, Baumgärtner W, Wewetzer K (2009)** Site-specific population dynamics and variable olfactory marker protein expression in the postnatal canine olfactory epithelium. *J Anat*. **215**: 522–535. https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2009.01147.x

38. **Böhm E, Brunert D, Rothermel M (2020)** Input dependent modulation of olfactory bulb activity by HDB GABAergic projections. *Sci Rep*. **10**(1): 10696. https://doi.org/10.1038/s41598-020-67276-z

39. **Boissy A, Terlouw C, Le Neindre, P (1998)** Presence of cues from stressed conspecifics increases reactivity to aversive events in cattle: evidence for the existence of alarm substances in urine. *Physiol Behav.* **4**: 489-95. https://doi.org/10.1016/s0031-9384(97)00466-6

40. **Bojsen-Møller F (1964)** Topography of the nasal glands in rats and some other mammals. *Anat Rec*. **150**: 11–24. https://doi.org/10.1002/ar.1091500103

41. **Bonfanti L, Peretto P, Merighi A, Fasolo A (1997)** Newly-generated cells from the rostral migratory stream in the accessory olfactory bulb of the adult rat. *Neuroscience*. **81**(2), 489-502. https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00090-0

42. **Booth W (1984)** Sexual dimorphism involving steroidal pheromones and their binding protein in the submaxillary salivary gland of the Göttingen miniature pig. *J Endocrinol.* **100**: 195-202. https://doi.org/10.1677/joe.0.1000195

43. **Booth WD, Signoret JP (1992)** Olfaction and reproduction in ungulates. *Oxf Rev Reprod Biol.* **14**: 263-301.

USC

44. **Bradshaw J, Cameron-Beaumont C (2000)** The signalling repertoire ot the domestic cat and its undomesticated relatives. *The Domestic Cat: The Biology of Its Behaviour.* 67-93.

45. **Breathnach AS (1960)** The cetacean central nervous system. *Biol Rev.* **35**: 187–230. https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1960.tb01414.x

46. **Brechbühl J, Klaey M, Moine F, Bovay E, Hurni N, Nenniger-Tosato M, Broillet MC (2014)** Morphological and physiological species-dependent characteristics of the rodent Grueneberg ganglion. *Front Neuroanat.* **8**: 87. https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00087

47. **Breipohl W, Bhatnagar KP, Mendoza A (1979)** Fine structure of the receptor-free epithelium in the vomeronasal organ of the rat. *Cell Tissue Res*. **200**(3): 383-395. https://doi.org/10.1007/BF00234850

48. **Brennan PA (2001)** The vomeronasal system. *Cell Mol Life Sci.* **58**: 546–555. https://doi.org/10.1007/PL00000880

49. **Brennan PA (2018)** 50 years of decoding olfaction. *Brain Neurosci Adv*. **2**: 2398212818817496. https://doi.org/10.1177/2398212818817496

50. **Brennan PA, Kendrick KM, Keverne EB (1995)** Neurotransmitter release in the accessory olfactory bulb during and after the formation of an olfactory memory in mice. *Neuroscience*. **69**(4): 1075–1086. https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00309-7

51. **Brennan PA, Keverne EB (2004)** Something in the air? New insights into mammalian pheromones. *Curr Biol*. **14**(2): R81-9. https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.12.052

52. **Brennan PA, Zufall F (2006)** Pheromonal communication in vertebrates. *Nature* **444**, 308–315. https://doi.org/10.1038/nature05404

53. **Breer H, Fleischer J, Strotmann J (2006)** The sense of smell: multiple olfactory subsystems. *Cell Mol Life Sci.* **63**: 1465–1475. https://doi.org/10.1007/s00018-006-6108-5

54. **Briñón JG, Weruaga E, Crespo C, Porteros A, Arévalo R, Aijón J, Alonso JR (2001)** Calretinin-, neurocalcin-, and parvalbumin-immunoreactive elements in the olfactory bulb of the hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *J Comp Neurol*. **429**(4): 554-70. https://doi.org/10.1002/1096-9861(20010122)429:4<554::AID-CNE4>3.0.CO;2-T

55. **Broadwell RD (1975)** Olfactory relationships of the telencephalon and diencephalon in the rabbit. I. An autoradiographic study of the efferent connections of the main and accessory olfactory bulbs. *J Comp Neurol.* **163**: 329 –345. https://doi.org/10.1002/cne.901630306

56. **Bronson FH, Caroom D (1971)** Preputial gland of the male mouse: attractant function. *J Reprod. Fert.* **25**: 279-282. https://doi.org/10.1530/jrf.0.0250279

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

57. **Bronson FH, Whitten WK (1968)** Oestrus-accelerating pheromone of mice: assay, androgen-dependency and presence in bladder urine. *J Reprod. Fert.* **15**: 131-134. https://doi.org/10.1530/jrf.0.0150131

58. **Brooks SA (2023)** Lectin Histochemistry: Historical Perspectives, State of the Art, and Future Directions. En C. Pellicciari, M. Biggiogera, & M. Malatesta (Eds.), *Histochemistry of Single Molecules* (Vol. 2566, pp. 65-84). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2675-7_6

59. **Broom R (1900)** VIII.—A Contribution to the Comparative Anatomy of the Mammalian Organ of Jacobson. *Earth Environ Sci Trans R Soc Edinb.* **39**(1): 231-255. https://doi.org/10.1017/S0080456800034074

60. **Broom R (1926)** On the organ of Jacobson and some other structures in the nose of Caenolestes. *Proc Linn Soc*. **1926**: 419–424. https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1926.tb08104.x

61. **Brown WL, Eisner T, Whittaker RH (1970)** Allomones and Kairomones: Transspecific Chemical Messengers. *BioScience* **20**: 21. https://doi.org/10.2307/1294753

62. **Brown RE (1979)** Mammalian Social Odors: A Critical Review. *Adv Study Behav.* **10**: 103-162. https://doi.org/10.1016/S0065-3454(08)60094-7

63. **Brunjes PC, Jazaeri A, Sutherland MJ (1992)** Olfactory bulb organization and development in *Monodelphis domestica* (grey shorttailed opossum). *J Comp Neurol*. **320**: 544–554. https://doi.org/10.1002/cne.903200411

64. **Buiakova OI, Baker H, Scott JW, Farbman A, Kream R, Grillo M, Franzen L, Richman M, Davis LM, Abbondanzo S, Stewart CL, Margolis FL (1996)** Olfactory marker protein (OMP) gene deletion causes altered physiological activity of olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci*. **93**(18): 9858-9863. https://doi.org/10.1073/pnas.93.18.9858

65. **Burger BV (2005)** Mammalian semiochemicals. *The Chemistry of Pheromones and Other Semiochemicals II*. 231-278. https://doi.org/10.1007/b98318

66. **Butenandt A, Beckmann R, Stamm D, Hecker E (1959)** Uber den sexsual-lockstoff des seidenspinners *Bombyx mori*. *Reindarstellung und konstitution. Z. Naturforschg* **14 b**, 283-284.

67. **Cádiz-Moretti B, Martínez-García F, Lanuza E (2013)** Neural substrate to associate odorants and pheromones: convergence of projections from the main and accessory olfactory bulbs in mice. In *Chemical signals in vertebrates* **12** (pp. 3-16). Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5927-9

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

68. **Cádiz-Moretti B, Otero-García M, Martínez-García F, Lanuza E (2016)** Afferent projections to the different medial amygdala subdivisions: a retrograde tracing study in the mouse. *Brain Struct Funct*. **221**(2): 1033-65. https://doi.org/10.1007/s00429-014-0954-y

69. **Cajal SRy (1902)** Textura del lóbulo olfativo accesorio. Trab del Lab de Invest Biol. Tomo 1. *Rev Micros* **1**, 141-50.

70. **Cajal SRy (1906)** Inducciones fisiológicas de la morfología y conexiones de las neuronas. *Archivos de Pedagogía y Ciencias Afines*, **1**.

71. **Calcagnile M, Tredici SM, Talà A, Alifano P (2019)** Bacterial Semiochemicals and Transkingdom Interactions with Insects and Plants. *Insects* **10**, 441. https://doi.org/10.3390/insects10120441

72. **Cartmill M (1974)** Rethinking Primate Origins: The characteristic primate traits cannot be explained simply as adaptations to arboreal life. *Science* **184**: 436-443. https://doi.org/10.1126/science.184.4135.436

73. **Castañeda MLA, Martínez-Gómez M, Guevara-Guzmán R, Hudson R (2007)** Chemical communication in domestic mammals. *Vet Mex.* **38**: 105-123.

74. **Catania KC (2006)** Underwater 'sniffing' by semi-aquatic mammals. Nature. **444**(7122): 1024-1025. https://doi.org/10.1038/4441024a

75. **Cavill GWK, Robertson PL (1965)** Ant Venoms, Attractants, and Repellents. *Science* **149**: 1337-1345. https://doi.org/10.1126/science.149.3690.1337

76. **Cayre M, Canoll P, Goldman JE (2009)** Cell migration in the normal and pathological postnatal mammalian brain. *Prog Neurobiol*. **88**: 41–63. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.02.001

77. **Chengetanai S, Bhagwandin A, Bertelsen MF, Hård T, Hof PR, Spocter MA, Manger PR (2020)** The brain of the African wild dog. II. The olfactory system. *J Comp Neurol*. **528**: 3285–3304. https://doi.org/10.1002/cne.25007

78. **Choi JH, Lee CH, Yoo KY, Hwang IK, Lee IS, Lee YL, Shin HC, Won MH (2010)** Age-related changes in calbindin-D28k, parvalbumin, and calretinin immunoreactivity in the dog main olfactory bulb. *Cell Mol Neurobiol*. **30**: 1–12. https://doi.org/10.1007/s10571-009-9425-z

79. **Chun J, Kang T, Seo JP, Jeong H, Kim M, Kim BS, Ahn M, Kim J, Shin T (2023)** Glycoconjugate-specific developmental changes in the horse vomeronasal organ. *Cells Tissues Organs*. 1-14. https://doi.org/10.1159/000528883

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

80. Clutton-Brock TH, Maccoll A, Chadwick P, Gaynor D, Kansky R, Skinner JD (1999) Reproduction and survival of suricates (*Suricata suricatta*) in the southern Kalahari. *Afr J Ecol.* **37**(1): 69-80. https://doi.org/10.1046/j.1365-2028.1999.00160.x

81. Conte YL, Hefetz A (2008) Primer Pheromones in Social Hymenoptera. *Annu Rev Entomol.* **53**: 523-542. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091434

82. Cork A, Kamal NQ, Alam SN, Choudhury JCS, Talekar NS (2003) Pheromones and their applications to insect pest control. *Bangl J Entomol.* **13**, 1-13.

83. Courtiol E, Wilson DA (2015) The olfactory thalamus: unanswered questions about the role of the mediodorsal thalamic nucleus in olfaction. *Front Neural Circuits*. **9**: 49. https://doi.org/10.3389/fncir.2015.00049

84. Crespo C, Liberia T, Blasco-Ibáñez JM, Nácher J, Varea E (2019) Cranial Pair I: The Olfactory Nerve. *Anat Rec*. **302**(3): 405-427. https://doi.org/10.1002/ar.23816

85. Crosby EC, Humphrey T (1941) Studies of the vertebrate telencephalon. II. The nuclear pattern of the anterior olfactory nucleus, tuberculum olfactorium and the amygdaloid complex in adult man. *J Comp Neurol*. **74**: 309-352. https://doi.org/10.1002/cne.900740209

86. Cuschieri A, Bannister LH (1974) Some histochemical observations on the mucosubstances of the nasal glands of the mouse. *Histochem J*. **6**(5): 543-558. https://doi.org/10.1007/BF01003270

87. Dagg AL, Taub A (1970) Flehmen. *De Gruyter*, **34**: 4. https://doi.org/10.1515/mamm.1970.34.4.686

88. De Saint Jan D (2022) Target-specific control of olfactory bulb periglomerular cells by GABAergic and cholinergic basal forebrain inputs. *Elife*. **11**: e71965. https://doi.org/10.7554/eLife.71965

89. Defteralı Ç, Moreno-Estellés M, Crespo C, Díaz-Guerra E, Díaz-Moreno M, Vergaño-Vera E, Nieto-Estévez V, Hurtado-Chong A, Consiglio A, Mira H, Vicario C (2021) Neural stem cells in the adult olfactory bulb core generate mature neurons in vivo. *Stem Cells*. **39**(9): 1253-1269. https://doi.org/10.1002/stem.3393

90. Dehmelt L, Halpain S (2005) The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol*. **6**(1): 1-10. https://doi.org/10.1186/gb-2004-6-1-204

91. Del Punta K, Puche A, Adams NC, Rodriguez I, Mombaerts P (2002) A divergent pattern of sensory axonal projections is rendered convergent by second-order neurons in the accessory olfactory bulb. *Neuron*. **35**(6): 1057-1066. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00904-2

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

92. **Del Punta K, Rothman A, Rodriguez I, Mombaerts P (2000)** Sequence diversity and genomic organization of vomeronasal receptor genes in the mouse. *Genome Res*. **10**(12): 1958-1967. https://doi.org/10.1101/gr.10.12.1958

93. **Dennis JC, Smith TD, Bhatnagar KP, Bonar CJ, Burrows AM, Morrison EE (2004)** Expression of neuron-specific markers by the vomeronasal neuroepithelium in six species of primates. *Anat Rec*. **281A**(1): 1190-1200. https://doi.org/10.1002/ar.a.20124

94. **Dennis JC, Stilwell NK, Smith TD, Park TJ, Bhatnagar KP, Morrison EE (2020)** Is the Mole Rat Vomeronasal Organ Functional?. *Anat Rec.* **303**(2): 318–329. https://doi.org/10.1002/ar.24060

95. **Devor M (1976)** Fiber trajectories of olfactory bulb efferents in the hamster. *J Comp Neurol*. **166**(1): 31-47. https://doi.org/10.1002/cne.901660104

96. **Dicke M, Sabelis MW (1988)** Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds? *Funct Ecol.* **2**: 131-139. https://doi.org/10.2307/2389687

97. **Ding X, Xie F (2015)** Olfactory Mucosa: Composition, Enzymatic Localization, and Metabolism. En R. L. Doty (Ed.), *Handbook of Olfaction and Gustation* (pp. 63-92). John Wiley & Sons, Inc. https://doi.org/10.1002/9781118971758.ch3

98. **Doetsch F, Alvarez-Buylla A (1996)** Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci*. **93**: 14895–14900. https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14895

99. **Dorries KM, Adkins-Regan E, Halpern BP (1995)** Olfactory sensitivity to the pheromone, androstenone, is sexually dimorphic in the pig. *Physiol Behav.* **57**(2): 255-259. https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)00225-T

100. **Døving KB, Trotier D (1998)** Structure and function of the vomeronasal organ. *J Exp Biol.* **201**(21): 2913–2925. https://doi.org/10.1242/jeb.201.21.2913

101. **Dryer L, Berghard A (1999)** Odorant receptors: a plethora of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci.* **20**(10): 413–417. https://doi.org/10.1016/s0165-6147(99)01381-4

102. **Dulac C, Axel R (1995)** A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell* **83**: 195–206. https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90161-2

103. **Dulac C, Torello AT (2003)** Molecular detection of pheromone signals in mammals: From genes to behaviour. *Nat Rev Neurosci*. **4**: 551–562. https://doi.org/10.1038/nrn1140

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

104. Dulac C, Wagner S (2006) Genetic analysis of brain circuits underlying pheromone signaling. *Annu Rev Genet*. **40**: 449-67. https://doi.org/10.1146/annurev.genet.39.073003.093937

105. Dunkelblum E, Mendel Z, Gries G, Gries R, Zegelman L, Hassner A, Mori K (1996) Antennal response and field attraction of the predator *Elatophilus hebraicus* (Hemiptera: Anthocoridae) to sex pheromones and analogues of three *Matsucoccus* spp. (Homoptera: Matsucoccidae). *Bioorg Med Chem.* **4**: 489-494. https://doi.org/10.1016/0968-0896(96)00030-2

106. Dursy E (1869) Zur Entwicklungsgeschichte des Kopfes des Menschen und der höheren Wirbelthiere: Mit Holzschnitten und einem Atlas von neun Kupfertafeln mit erklärendem Texte.

107. Eccles R (1982) Autonomic innervation of the vomeronasal organ of the cat. *Physiol Behav*. **28**(6): 1011-5. https://doi.org/10.1016/0031-9384(82)90168-8

108. Eisenberg JF (1963) A comparative study of sandbathing behavior in heteromyid rodents. *Behav.* **22**: 16-23. https://doi.org/10.1163/156853963X00284

109. Eisenberg JF, Kleiman DG (1972) Olfactory communication in mammals. *Annu Rev Ecol Evol Syst.* **3**: 1-32. https://doi.org/10.1146/annurev.es.03.110172.000245

110. Eisthen HL (2000) Presence of the vomeronasal system in aquatic salamanders. *Philos Trans R Soc Lond B, Biol Sci.* **355**: 1401. https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0669

111. Elgayar SAM, Eltony SA, Othman MA (2014) Morphology of non-sensory epithelium during post-natal development of the rabbit vomeronasal organ. *Anat Hist Embryol.* **43**(4): 282-293. https://doi.org/10.1111/ahe.12073

112. Emam MA, El-Shafey AA, Kassab AA (2016) Expression of Neuronal and Non-Neuronal Markers in the Vomeronasal Organs of One-Humped Camel (*Camelus dromedarius*) and Egyptian Water Buffalo (*Bubalus bubalis*). *Int J Morphol*. **34**(4): 1211-1217. https://doi.org/10.4067/S0717-95022016000400006

113. Estes R (1972) The role of the vomeronasal organ in mammalian reproduction. https://doi.org/10.1515/mamm.1972.36.3.315

114. Ewer RF (1968) Ethology of mammals. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-4656-0

115. Fan S, Luo M (2009) The organization of feedback projections in a pathway important for processing pheromonal signals. *Neurosci*. **161**(2): 489-500. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.03.065

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

116. Ferkin MH, Johnston RE (1995) Meadow voles, *Microtus pennsylvanicus*, use multiple sources of scent for sex recognition. *Anim Behav.* **49**: 37-44. https://doi.org/10.1016/0003-3472(95)80151-0

117. Fernández-Aburto P, Delgado SE, Sobrero R, Mpodozis J (2020) Can social behaviour drive accessory olfactory bulb asymmetries? Sister species of caviomorph rodents as a case in point. *J Anat*. **236**: 612–621. https://doi.org/10.1111/joa.13126

118. Fernández-Flores F, García-Verdugo JM, Martín-Ibáñez R, Herranz C, Fondevila D, Canals JM, Arús C, Pumarola M (2018) Characterization of the canine rostral ventricular-subventricular zone: Morphological, immunohistochemical, ultrastructural, and neurosphere assay studies. *J Comp Neurol*. **526**: 721–741. https://doi.org/10.1002/cne.24365

119. Ferrero DM, Moeller LM, Osakada T, Horio N, Li Q, Roy DS, Cichy A, Spehr M, Touhara K, Liberles SD (2013) A juvenile mouse pheromone inhibits sexual behaviour through the vomeronasal system. *Nature* **502**: 368-71. https://doi.org/10.1038/nature12579

120. Filoramo NI, Schwenk K (2009) The mechanism of chemical delivery to the vomeronasal organs in squamate reptiles: a comparative morphological approach. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol.* **311**(1): 20-34. https://doi.org/10.1002/jez.492

121. Fleischer J, Breer H (2010) The Grueneberg ganglion: A novel sensory system in the nose. *Histol Histopathol.* **25**(7): 909-15. https://doi.org/10.14670/HH-25.909

122. Fleischer J, Schwarzenbacher K, Besser S, Hass N, Breer H (2006) Olfactory receptors and signalling elements in the Grueneberg ganglion. *J Neurochem.* **98**(2): 543-54. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03894.x

123. Frahm HD, Bhatnagar KP (1980) Comparative morphology of the accessory olfactory bulb in bats. *J Anat*. **130**(Pt 2): 349.

124. Frahm HD, Stephan H, Baron G (1984) Comparison of brain structure volumes in insectivora and primates. V. Area striata (AS). *J Hirnforsch.* **25**(5): 537-557.

125. Franke WW, Schiller DL, Moll R, Winter S, Schmid E, Engelbrecht I, Denk H, Krepler R, Platzer B (1981) Diversity of cytokeratins. *J Mol Biol*. **153**(4): 933-959. https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90460-5

126. Fu X, Yan Y, Xu PS, Geerlof-Vidavsky I, Chong W, Gross ML, Holy TE (2015) A molecular code for identity in the vomeronasal system. *Cell*. **163**(2): 313-323. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.012

127. Galliano E, Hahn C, Browne LP, Villamayor PR, Tufo C, Crespo A, Grubb MS (2021) Brief sensory deprivation triggers cell type-specific structural and functional

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

plasticity in olfactory bulb neurons. *J Neurosci*. **41**: 2135–2151. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1606-20.2020

128. Gallie DR, Chang SC (1997) Signal Transduction in the Carnivorous Plant Sarracenia purpurea (Regulation of secretory hydrolase expression during development and in response to resources). *Plant Physiol.* **115**: 1461–1471. https://doi.org/10.1104/pp.115.4.1461

129. Garrett EC, Dennis JC, Bhatnagar KP, Durham EL, Burrows AM, Bonar CJ, Steckler NK, Morrison EE, Smith TD (2013) The vomeronasal complex of nocturnal strepsirhines and implications for the ancestral condition in primates. *Anat Rec.* **296**(12): 1881-94. https://doi.org/10.1002/ar.22828

130. Garrosa M, Gayoso MJ, Esteban FJ (1998) Prenatal development of the mammalian vomeronasal organ. *Microsc Res Tech.* **41**(6): 456-470. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19980615)41:6<456::AID-JEMT2>3.0.CO;2-L

131. Getchell ML, Boggess MA, Pruden Li SJ, Little SS, Buch S, Getchell TV (2002) Expression of TGF-β type II receptors in the olfactory epithelium and their regulation in TGF-α transgenic mice. *Brain Res*. **945**(2): 232-241. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)02805-6

132. Gomez DM, Newman SW (1992) Differential projections of the anterior and posterior regions of the medial amygdaloid nucleus in the Syrian hamster. *J Comp Neurol*. **317**(2): 195-218. https://doi.org/10.1002/cne.903170208

133. González A, Morona R, López JM, Moreno N, Northcutt RG (2010) Lungfishes, like tetrapods, possess a vomeronasal system. *Front Neuroanat.* **4**: 130. https://doi.org/10.3389/fnana.2010.00130

134. Goodwin M, Gooding KM, Regnier F (1979) Sex pheromone in the dog. *Science* **203**: 559-61. https://doi.org/10.1126/science.569903

135. Gorman ML, Trowbridge BJ (2019) The Role of Odor in the Social Lives of Carnivores. In *Carnivore Behavior, Ecology and Evolution*; Gittleman, J.L., Ed.; Cornell University Press: Ithaca, NY, USA; pp. 57–88.

136. Gosling LM (1982) A reassessment of the function of scent marking in territories. *Z. Tierpsychol.* **60**: 89-118. https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.1982.tb00492.x

137. Gouda M, Matsutani S, Senba E, Tohyama M (1990) Peptidergic granule cell populations in the rat main and accessory olfactory bulb. *Brain Res.* **512**(2): 339-342. https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90645-RGet rights and content

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

138. Grüneberg H (1973) A ganglion probably belonging to the N. terminalis system in the nasal mucosa of the mouse. *Z Anat Entwicklungsgesch.* **140**: 39–52. https://doi.org/10.1007/BF00520716

139. Grus WE, Shi P, Zhang J (2007) Largest Vertebrate Vomeronasal Type 1 Receptor Gene Repertoire in the Semiaquatic Platypus. *Mol Biol Evol.* **24**(10): 2153–2157. https://doi.org/10.1093/molbev/msm157

140. Grus WE, Zhang J (2004) Rapid turnover and species-specificity of vomeronasal pheromone receptor genes in mice and rats. *Gene*. **340**(2): 303-312. https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.07.037

141. Grus WE, Zhang J (2006) Origin and evolution of the vertebrate vomeronasal system viewed through system-specific genes. *Bioessays* **28**(7): 709-718. https://doi.org/10.1002/bies.20432

142. Grus WE, Zhang J (2009) Origin of the genetic components of the vomeronasal system in the common ancestor of all extant vertebrates. *Mol Biol Evol*. **26**(2): 407-419. https://doi.org/10.1093/molbev/msn262

143. Gudden BV (1870) Experimentaluntersuchungen über das peripherische und centrale Nervensystem. *Arch Psychiatr Nervenkr*. **2**: 693-723.

144. Gutiérrez-Castellanos N, Pardo-Bellver C, Martínez-García F, Lanuza E (2014) The vomeronasal cortex - afferent and efferent projections of the posteromedial cortical nucleus of the amygdala in mice. *Eur J Neurosci*. **39**(1): 141–158. https://doi.org/10.1111/ejn.12393

145. Halpern M (1992) Nasal chemical senses in reptiles: structure and function. *Hormones, Brain, and Behaviour. Biology of the Reptilia* **18** Physiology E.

146. Halpern M, Daniels Y, Zuri I (2005) The role of the vomeronasal system in food preferences of the gray short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. *Nutr Metab. (Lond)* **2**(1): 6. https://doi.org/10.1186/1743-7075-2-6

147. Halpern M, Kubie JL (1984) The role of the ophidian vomeronasal system in species-typical behavior. *Trends Neurosci.* **7**(12): 472-477. https://doi.org/10.1016/S0166-2236(84)80258-1.

148. Halpern M, Martínez-Marcos A (2003) Structure and function of the vomeronasal system: an update. *Prog Neurobiol*. **70**(3): 245-318. https://doi.org/10.1016/s0301-0082(03)00103-5

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

149. Halpern M, Shapiro LS, Jia C (1995) Differential localization of G proteins in the opossum vomeronasal system. *Brain Res.* **677**: 157-61. https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00159-n

150. Halpern M, Shapiro LS, Jia C (1998) Heterogeneity in the Accessory Olfactory System. *Chem Senses*. **23**: 477-481. https://doi.org/10.1093/chemse/23.4.477

151. Han B, Chen Z (2002) Behavioral and electrophysiological responses of natural enemies to synomones from tea shoots and kairomones from tea aphids, *Toxoptera aurantii. J Chem Ecol.* **28**: 2203-19. https://doi.org/10.1023/a:1021045231501

152. Harrington FH (1982) Urine marking at food and caches in captive coyotes. *Can. J. Zool.* **60**: 776-782. https://doi.org/10.1139/z82-107

153. Hart BL (1983) Flehmen behavior and vomeronasal organ function. *Chemical Signals in Vertebrates 3* 87-103.

154. Hart LA, Hart BL (2023) Flehmen, Osteophagia, and Other Behaviors of Giraffes (*Giraffa giraffa angolensis*): Vomeronasal Organ Adaptation. *Animals* **19**: 13(3):354. https://doi.org/10.3390/ani13030354

155. Hart BL, Hart LA, Maina JN (1988) Alteration in vomeronasal system anatomy in alcelaphine antelopes: Correlation with alteration in chemosensory investigation. *Physiol Behav*. **42**(2): 155-162. https://doi.org/10.1016/0031-9384(88)90291-0

156. Hatanaka T, Matsuzaki O (1993) Odor responses of the vomeronasal system in Reeve's turtle, *Geoclemys reevesii*. *Brain Behav Evol.* **41**: 183–186. https://doi.org/10.1159/000113836

157. Hayes RA, Richardson BJ, Claus SC, Wyllie SG (2002b) Semiochemicals and social signaling in the wild european rabbit in australia: II. variations in chemical composition of chin gland secretion across sampling sites. *J Chem Ecol.* **28**: 2613-2625. https://doi.org/10.1023/a:1021452623055

158. Hayes RA, Richardson BJ, Wyllie SG (2002a) Semiochemicals and social signaling in the wild european rabbit in australia: I. scent profiles of chin gland secretion from the field. *J Chem Ecol.* **28**: 363-84. https://doi.org/10.1023/a:1017942426467

159. Hayes RA, Richardson BJ, Wyllie SG (2003). To fix or not to fix: the role of 2-phenoxyethanol in rabbit, Oryctolagus cuniculus, chin gland secretion. *J Chem Ecol*. **29**(5): 1051–1064. https://doi.org/10.1023/A:1023836319677

160. Hepper PG, Wells DL (2006) Prenatal olfactory learning in the domestic dog. *Chem Senses* **31**: 207–212. https://doi.org/10.1093/chemse/bjj020

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

161. Heesy CP, Ross CF (2001) Evolution of activity patterns and chromatic vision in primates: morphometrics, genetics and cladistics. *J Hum Evol.* **40**(2): 111-149. https://doi.org/10.1006/jhev.2000.0447

162. Herrada G, Dulac C (1997) A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution. *Cell* **90**: 763-73. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80536-x

163. Hinds JW (1968) Autoradiographic study of histogenesis in the mouse olfactory bulb I. Time of origin of neurons and neuroglia. *J Comp Neurol*. **134**(3): 287-304. https://doi.org/10.1002/cne.901340304

164. Höfer D, Shin DW, Drenckhahn D (2000) Identification of cytoskeletal markers for the different microvilli and cell types of the rat vomeronasal sensory epithelium. *J Neurocytol.* **29**: 147–156. https://doi.org/10.1023/A:1026548020851

165. Hohenbrink P, Mundy NI, Zimmermann E, Radespiel U (2013) First evidence for functional vomeronasal 2 receptor genes in primates. *Biol. Lett.* **9**: 20121006. https://doi.org/10.1098/rsbl.2012.1006

166. Houck LD (2009) Pheromone communication in amphibians and reptiles. *Annu Rev Physiol.* **71**: 161-176. https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.010908.163134

167. Hovis KR, Ramnath R, Dahlen JE, Romanova AL, LaRocca G, Bier ME, Urban NN (2012) Activity regulates functional connectivity from the vomeronasal organ to the accessory olfactory bulb. *J Neurosci*. **32**(23): 7907-7916. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2399-11.2012

168. Hradecký P (1985) Possible pheromonal regulation of reproduction in wild carnivores. *J Chem Ecol.* **11**: 241–250. https://doi.org/10.1007/BF00988206

169. Huang Z, Thiebaud N, Fadool DA (2017) Differential serotonergic modulation across the main and accessory olfactory bulbs. *J Physiol*. **595**(11): 3515-3533. https://doi.org/10.1113/JP273945

170. Hughes L (2020) Meerkats: Essential Wildlife; Character-19 ed.: Swindon, UK.

171. Ibokwe CO, Okpe GC (2009) Morphological Studies Of Vomeronasal Organ In The Wild Juvenile Red-Flanked Duiker *Cephalophus rufilatus* (GRAY 1864). *Anim Res Int.* **6**(1). https://doi.org/10.4314/ari.v6i1.48096

172. Ibrahim D (2018) Immunolocalization of Receptor and Chemoreceptor Modules in the Sheep Vomeronasal Organ. *Cells Tissues Organs*. **205**(2): 85-92. https://doi.org/10.1159/000487758

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

173. Ibrahim D, Nakamuta N, Taniguchi K, Taniguchi K (2013) Lectin Histochemical Studies on the Vomeronasal Organ of the Sheep. *J Vet Med Sci*. **75**(9): 1131-1137. https://doi.org/10.1292/jvms.12-0532

174. Ichikawa M, Osada T, Ikai A (1992) *Bandeiraea simplicifolia* lectin I and *Vicia villosa* agglutinin bind specifically to the vomeronasal axons in the accessory olfactory bulb of the rat. *Neurosci Res.* **13**: 73-9. https://doi.org/10.1016/0168-0102(92)90035-B

175. Igbokwe CO, Nwaogu IC (2009) Histological studies of the vomeronasal organ of African giant rat (*Cricetomys gambianus*, Waterhouse). *Anim Res Int.* **6**(2). https://doi.org/10.4314/ari.v6i2.48132

176. Imam A, Bhagwandin A, Ajao MS, Spocter MA, Ihunwo AO, Manger PR (2018) The brain of the tree pangolin (*Manis tricuspis*). II. The olfactory system. *J Comp Neurol*. **526**: 2548–2569. https://doi.org/10.1002/cne.24510

177. Inaki K, Nishimura S, Nakashiba T, Itohara S, Yoshihara Y (2004) Laminar organization of the developing lateral olfactory tract revealed by differential expression of cell recognition molecules. *J Comp Neurol.* **479**(3): 243-256. https://doi.org/10.1002/cne.20270

178. Inbar T, Davis R, Bergan JF (2022) A sex-specific feedback projection from aromatase-expressing neurons in the medial amygdala to the accessory olfactory bulb. *J Comp Neurol*. **530**(3): 648-655. https://doi.org/10.1002/cne.25236

179. Iovino M, Messana T, Iovino E, De Pergola G, Guastamacchia E, Giagulli VA, Triggiani V (2019) Neuroendocrine Mechanisms Involved in Male Sexual and Emotional Behavior. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* **19**: 472–480. https://doi.org/10.2174/1871530319666190131155310

180. Iwanaga T, Han H, Kanazawa H, Fujita T (1992) Immunohistochemical localization of protein gene product 9.5 (PGP 9.5) in sensory paraneurons of the rat. *Biomed Res*. **13**(3): 225-230. https://doi.org/10.2220/biomedres.13.225

181. Iwanaga T, Takahashi Y, Fujita T (1989) Immunohistochemistry of neuron-specific and glia-specific proteins. *Arch Histol Cytol*. **52**(Suppl): 13-24. https://doi.org/10.1679/aohc.52.Suppl_13

182. Izard MK (1983) Pheromones and reproduction in domestic animals. *Pheromones and reproduction in mammals.*

183. Jacobowitz DM, Winsky L (1991) Immunocytochemical localization of calretinin in the forebrain of the rat. *J Comp Neurol.* **304**: 198–218. https://doi.org/10.1002/cne.903040205

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

184. Jacobs VL, Sis RF, Chenoweth PJ, Klemm WR, Sherry CJ (1981) Structures of the Bovine Vomeronasal Complex and Its Relationships to the Palate: Tongue Manipulation. *Cells Tissues Organs*. **110**(1): 48-58. https://doi.org/10.1159/000145412

185. Jacobson LL (1813) Anatomisk Beskrivelse over et nyt Organ I Huusdyrenes Naerse. *Veter Salesk Skrift*. **2**: 209−246.

186. Jang S, Kim B, Kim JS, Moon C (2021) Histology and lectin histochemistry in the vomeronasal organ of Korean native cattle, *Bos taurus coreanae*. *J Anim Reprod Biotechnol*. **36**(4): 270-284. https://doi.org/10.12750/JARB.36.4.270

187. Jawlowski H (1956) On the bulbus olfactorius and bulbus olfactorius accessories of some mammals. *Lub Uniw MariiCurie-Sklodowskiej Roczniki Annls Dzialc Nauk Biol*. **10**: 67–86.

188. Jia C, Chen WR, Shepherd GM (1999) Synaptic organization and neurotransmitters in the rat accessory olfactory bulb. *J Neurophysiol*. **81**(1): 345-355. https://doi.org/10.1152/jn.1999.81.1.345

189. Jia C, Halpern M (1996) Subclasses of vomeronasal receptor neurons: Differential expression of G proteins (Gi alpha 2 and G (o alpha)) and segregated projections to the accessory olfactory bulb. *Brain Res*. **719**: 117–128. https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00110-2

190. Jia C, Halpern M (2003) Calbindin D28K immunoreactive neurons in vomeronasal organ and their projections to the accessory olfactory bulb in the rat. *Brain Res.* **977**(2): 261-269. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)02693-3

191. Jia C, Halpern M (2004) Calbindin D28k, parvalbumin, and calretinin immunoreactivity in the main and accessory olfactory bulbs of the gray short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. *J Morphol*. **259**(3): 271-280. https://doi.org/10.1002/jmor.10166

192. Johnson EW, Eller PM, Jafek BW (1994) Protein gene product 9.5 in the developing and mature rat vomeronasal organ. *Brain Res Dev*. **78**(2): 259-264. https://doi.org/10.1016/0165-3806(94)90034-5

193. Johnson EW, Rasmussen LEL (2002) Morphological characteristics of the vomeronasal organ of the newborn Asian elephant (*Elephas maximus*). *Anat Rec.* **267**(3): 252-259. https://doi.org/10.1002/ar.10112

194. Johnson RP (1973) Scent marking in mammals. *Anim. Behav.* **21**: 521-535. https://doi.org/10.1016/S0003-3472(73)80012-0

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

195. Jones RB, Nowell NW (1974) A comparison of the aversive and female attractant properties of urine from dominant and subordinate male mice. *Anim Learn Behav.* **2**: 141-144. https://doi.org/10.3758/BF03199141

196. Jones RL, Lewis WJ, Bowman MC, Beroza M, Bierl BA (1971) Host-Seeking Stimulant for Parasite of Corn Earworm: Isolation, Identification, and Synthesis. *Science* **173**: 842-843. https://doi.org/10.1126/science.173.3999.842

197. Jordan NR, Golabek KA, Apps PJ, Gilfillan GD, McNutt JW (2013) Scent-Mark Identification and Scent-Marking Behaviour in African Wild Dogs (*Lycaon pictus*). *Ethology* **119**: 644-652. https://doi.org/10.1111/eth.12105

198. Juilfs DM, Fülle HJ, Zhao AZ, Houslay MD, Garbers DL, Beavo JA (1997) A subset of olfactory neurons that selectively express cGMP-stimulated phosphodiesterase (PDE2) and guanylyl cyclase-D define a unique olfactory signal transduction pathway. *PNAS* **94**(7): 3388-3395. https://doi.org/10.1073/pnas.94.7.3388

199. Jungblut LD, Pozzi AG, Paz DA (2013) El sistema vomeronasal y su posible funcionalidad en larvas de anuros. *Cuad Herpetol.* **27**(1): 1852-5768.

200. Jurcisek JA, Durbin JE, Kusewitt DF, Bakaletz LO (2003) Anatomy of the nasal cavity in the chinchilla. *Cells Tissues Organs.* **174**(3): 136-152. https://doi.org/10.1159/000071154

201. Kaminski J, Marshall-Pescini S (2014) The Social Dog: Behaviour and Cognition; Academic Press: San Diego, CA, USA.

202. Karlson P, Luscher M (1959) 'Pheromones': a new term for a class of biologically active substances. *Nature* **183**: 55–56.

203. Kasinger H, Bauer B, Denzinger J (2008) The Meaning of Semiochemicals to the Design of Self-Organizing Systems. *IEEE.* https://doi.org/10.1109/SASO.2008.51

204. Kelliher KR, Baum MJ, Meredith M (2001) The ferret's vomeronasal organ and accessory olfactory bulb: Effect of hormone manipulation in adult males and females. *Anat Rec*. **263**: 280–288. https://doi.org/10.1002/ar.1097

205. Kelly D (2000) Recent Advances in Semiochemistry.

206. Keverne EB, Brennan PA (1996) Olfactory recognition memory. *J Physiol Paris*. **90**(5-6): 399-401. https://doi.org/10.1016/s0928-4257(97)87929-6

207. Kinzinger JH, Johnson EW, Bhatnagar KP, Bonar CJ, Burrows AM, Mooney MP, Siegel MI, Smith TD (2005) Comparative study of lectin reactivity in the vomeronasal

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

organ of human and nonhuman primates. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. **284**: 550–560. https://doi.org/10.1002/ar.a.20194

208. Kishida T (2021) Olfaction of aquatic amniotes. *Cell Tissue Res.* **383**: 353–365. https://doi.org/10.1007/s00441-020-03382-8

209. Kishida T, Thewissen J, Usip S, Suydam RS, George JC (2015) Organization and distribution of glomeruli in the bowhead whale olfactory bulb. *PeerJ*. **3**: e897. https://doi.org/10.7717/peerj.897

210. Kishimoto J, Keverne EB, Emson PC (1993) Calretinin, calbindin-D28k and parvalbumin-like immunoreactivity in mouse chemoreceptor neurons. *Brain Res.* **610**: 325-329. https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)91417-q

211. Kiyokawa Y, Kikusiu T, Takeuchi Y, Mori Y (2004) Modulatory role of testosterone in alarm pheromone release by male rats. *Horm Behav.* **45**: 122-127. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2003.09.007

212. Klein E (1881) Memoirs: Contributions to the Minute Anatomy of the Nasal Mucous Membrane. *J Cell Sci*. **2**(81): 98-113. https://doi.org/10.1242/jcs.s2-21.81.98

213. Kokocińska-Kusiak A, Woszczyło M, Zybala M, Maciocha J, Barlowska K, Dzięcioł M (2021) Canine Olfaction: Physiology, Behavior, and Possibilities for Practical Applications. *Animals* **11**: 2463. https://doi.org/10.3390/ani11082463

214. Kölliker (1877) Über die Behandlung der Syphilis mit subcutanen Calomel-Injectionen.

215. Kondoh D, Kamikawa A, Sasaki M, Kitamura N (2017b) Localization of α1-2 fucose glycan in the mouse olfactory pathway. *Cells Tissues Organs.* **203**(1): 20-28. https://doi.org/10.1159/000447009

216. Kondoh D, Kaneoya Y, Tonomori W, Kitayama C (2023) Histological features and Gαolf expression patterns in the nasal cavity of sea turtles. *J Anat*. https://doi.org/10.1111/joa.13873

217. Kondoh D, Kawai YK, Watanabe K, Muranishi Y (2022) Artiodactyl livestock species have a uniform vomeronasal system with a vomeronasal type 1 receptor (V1R) pathway. *Tissue Cell*. **77**: 101863. https://doi.org/10.1016/j.tice.2022.101863

218. Kondoh D, Sasaki M, Kitamura N (2018) Age-dependent decrease in glomeruli and receptor cells containing α1–2 fucose glycan in the mouse main olfactory system but not in the vomeronasal system. *Cell Tissue Res*. **373**: 361-366. https://doi.org/10.1007/s00441-018-2819-9

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

219. Kondoh D, Tanaka Y, Kawai YK, Mineshige T, Watanabe K, Kobayashi Y (2021) Morphological and histological features of the vomeronasal organ in african pygmy hedgehog (*Atelerix albiventris*). *Animals.* **11**(5): 1462. https://doi.org/10.3390/ani11051462

220. Kondoh D, Tomiyasu J, Itakura R, Sugahara M, Yanagawa M, Watanabe K, Alviola PA, Yap SA, Cosico EA, Cruz FA, Larona AR, Manalad A, Masangkay JS, Sugiura Y, Kyuwa S, Watanabe S, Une Y, Omatsu T, Bando H, Kato K (2020) Comparative histological studies on properties of polysaccharides secreted by vomeronasal glands of eight Laurasiatheria species. *Acta Histochem*. **122**(3): 151515. https://doi.org/10.1016/j.acthis.2020.151515

221. Kondoh D, Watanabe K, Nishihara K, Ono YS, Nakamura KG, Yuhara K, Tomikawa S, Sugimoto M, Kobayashi S, Horiuchi N, Kobayashi Y, Sasaki M, Kitamura N (2017a) Histological Properties of Main and Accessory Olfactory Bulbs in the Common Hippopotamus. *Brain Behav Evol*. **90**: 224-231. https://doi.org/10.1159/000479180

222. Kratzing J (1971) The structure of the vomeronasal organ in the sheep. *J Anat*. **108**(Pt 2): 247-260.

223. Krishna NSR, Getchell ML, Margolis FL, Getchell TV (1995) Differential expression of vomeromodulin and odorant-binding protein, putative pheromone and odorant transporters, in the developing rat nasal chemosensory mucosae. *J Neurosci Res*. **40**(1): 54-71. https://doi.org/10.1002/jnr.490400107

224. Kukekova AV, Johnson JL, Xiang X, Feng S, Liu S, Rando HM, Kharlamova AV, Herbeck Y, Serdyukova NA, Xiong Z, Beklemischeva V, Koepfli KP, Gulevich RG, Vladimirova AV, Hekman JP, Perelman PL, Graphodatsky AS, O'Brien SJ, Wang X, … Zhang G (2018) Red fox genome assembly identifies genomic regions associated with tame and aggressive behaviours. *Nat Ecol Evol*. **2**(9): 1479-1491. https://doi.org/10.1038/s41559-018-0611-6

225. Landaeta-Hernández AJ, Ungerfeld R, Chenoweth PJ (2023) Biostimulation and pheromones in livestock: A review. *Anim Reprod Sci*. **248**: 107154. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.107154

226. Larriva-Sahd J (2008) The accessory olfactory bulb in the adult rat: a cytological study of its cell types, neuropil, neuronal modules, and interactions with the main olfactory system. *J Comp Neurol*. **510**(3), 309-350. https://doi.org/10.1002/cne.21790

227. Larriva-Sahd JA (2012) Cytological organization of the alpha component of the anterior olfactory nucleus and olfactory limbus. *Front Neuroanat.* **6**: 23. https://doi.org/10.3389/fnana.2012.00023

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

228. Laska M, Bauer V, Salazar LTH (2007) Self-anointing behavior in free-ranging spider monkeys (*Ateles geoffroyi*) in Mexico. *Primates* **48**: 160–163. https://doi.org/10.1007/s10329-006-0019-9

229. Lass S, Bittner K (2002) Facing multiple enemies: parasitised hosts respond to predator kairomones. *Oecologia* **132**: 344-349. https://doi.org/10.1007/s00442-002-0982-9

230. Law JF, Regnier FE (1971) Pheromones. *Annu Rev Biochem.* **40**: 533-548. https://doi.org/10.1146/annurev.bi.40.070171.002533

231. Lazzari M, Bettini S, Franceschini V (2016) Immunocytochemical characterization of ensheathing glia in the olfactory and vomeronasal systems of *Ambystoma mexicanum* (Caudata: Ambystomatidae). *Brain Struct Funct*. **221**: 955–967. https://doi.org/10.1007/s00429-014-0949-8

232. Le Jeune H, Aubert I, Jourdan F, Quirion R (1995) Comparative laminar distribution of various autoradiographic cholinergic markers in adult rat main olfactory bulb. *J Chem Neuroanat*. **9**(2): 99-112. https://doi.org/10.1016/0891-0618(95)00070-N

233. Leclaire S, Nielsen JF, Thavarajah NK, Manser M, Clutton-Brock TH (2013) Odour-based kin discrimination in the cooperatively breeding meerkat. *Biol Lett*. **9**(1): 20121054. https://doi.org/10.1098/rsbl.2012.1054

234. Lee KH, Park C, Kim J, Moon C, Ahn M, Shin T (2016) Histological and lectin histochemical studies of the vomeronasal organ of horses. *Tissue Cell.* **48**: 361–369. https://doi.org/10.1016/j.tice.2016.05.002

235. Lee VMY, Otvos L Jr, Carden MJ, Hollosi M, Dietzschold B, Lazzarini RA (1988) Identification of the major multiphosphorylation site in mammalian neurofilaments. *Proc Natl Acad Sci*. **85**: 1998–2002. https://doi.org/10.1073/pnas.85.6.1998

236. Liberia T, Blasco-Ibáñez JM, Nácher J, Varea E, Lanciego JL, Crespo C (2015) Synaptic connectivity of the cholinergic axons in the olfactory bulb of the cynomolgus monkey. *Front Neuroanat*. **9**: 28. https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00028

237. Liberles SD (2014) Mammalian pheromones. *Annu Rev Physiol.* **76**: 151-175. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021113-170334

238. Liman ER, Corey DP, Dulac C (1999) TRP2: a candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 5791–5796. https://doi.org/10.1073/pnas.96.10.5791

239. Lin DY, Zhang SZ, Block E, Katz LC (2005) Encoding social signals in the mouse main olfactory bulb. *Nature* **434**, 470–477. https://doi.org/10.1038/nature03414

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

240. Lo L & Anderson DJ (2011) A Cre-dependent, anterograde transsynaptic viral tracer for mapping output pathways of genetically marked neurons. *Neuron*. **72**(6): 938–950. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.12.002

241. Lombardero M (1997) Contribución al estudio del órgano vomeronasal y del bulbo olfatorio accesorio de la oveja**.** Tesis Doctoral. Universidade de Santiago de Compostela.

242. Loo SK, Kanagasunteram R (1972) The vomeronasal organ in tree shrew and slow loris. *J Anat*. **112**(Pt 2): 165-172.

243. Luckhaus G (1969) Licht- und elektronemikroskopixhe Befunde an der Lamina epithelialis des Vomeronasalorgans vom Kaninchen *Anat Anz*. **124**(5): 477-89.

244. Lundberg LM, Alm P, Wharton J, Polak JM (1988) Protein gene product 9.5 (PGP 9.5). *Histochemistry*. **90**(1): 9-17. https://doi.org/10.1007/bf00495700

245. Ma M, Grosmaitre X, Iwema CL, Baker H, Greer CA, Shepherd GM (2003) Olfactory signal transduction in the mouse septal organ. *J Neurosci*. **23**: 317–324. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-01-00317.2003

246. Macdonald DW, Krantz K, Aplin RT (1984) Behavioural, anatomical and chemical aspects of scent marking amongst Capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) (Rodentia: Caviomorpha). *J Zool.* **202**: 341-360. https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1984.tb05087.x

247. Mackay-Sim A, Duvall D, Graves BM (1985) The West Indian manatee (*Trichechus manatus*) lacks a vomeronasal organ. *Brain Behav Evol*. **27**: 186–194. https://doi.org/10.1159/000118729

248. Mahdy EA (2019) Comparative morpho-histological analysis on the vomeronasal organ and the accessory olfactory bulb in Balady dogs (*Canis familiaris*) and New Zealand rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *J Adv Vet Anim Res.* **6**(4): 506.

249. Malnic B, Hirono J, Sato T, Buck LB (1999) Combinatorial receptor codes for odors. *Cell*, **96**(5): 713–723. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80581-4

250. Malz CR, Knabe W, Kuhn HJ (2000) Pattern of calretinin immunoreactivity in the main olfactory system and the vomeronasal system of the tree shrew, *Tupaia belangeri*. *J Comp Neurol*. **420**(4): 428-436. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(20000515)420:4<428::AID-CNE2>3.0.CO;2-2

251. Malz CR, Knabe W, Kuhn HJ (2002) Calretinin immunoreactivity in the prenatally developing olfactory systems of the tree shrew *Tupaia belangeri*. *Anat Embryo*. **205**: 83–97. https://doi.org/10.1007/s00429-002-0244-y

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

252. Marshall DA, Maruniak JA (1986) Masera's organ responds to odorants. *Brain Res.* 366: 329-332. https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)91312-0

253. Martín J, Barja I, López P (2010) Chemical scent constituents in feces of wild Iberian wolves (*Canis lupus signatus*). *Biochem Syst Ecol.* **38**: 1096-1102. https://doi.org/10.1016/j.bse.2010.10.014

254. Martín-López E, Corona R, López-Mascaraque L (2012) Postnatal characterization of cells in the accessory olfactory bulb of wild type and reeler mice. *Front Neuroanat*. **6**: 15. https://doi.org/10.3389/fnana.2012.00015

255. Martinez-Marcos A (2009) On the organization of olfactory and vomeronasal cortices. *Prog Neurobiol*. **87**(1): 21–30. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2008.09.010

256. Mathers ME, Pollock AM, Marsh C, O'Donnell M (2002) Cytokeratin 7: a useful adjunct in the diagnosis of chromophobe renal cell carcinoma. *Histopathology*. **40**(6): 563-567. https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.2002.01397.x

257. Matsubara, K., Akaogi, Nakamuta, S., Tsuj, & Nakamuta N (2019) Characteristics of Olfactory Organs in Sika Deer (*Cervus nippon*). *Jpn J Zoo Wildl Med*. **24**(3): 115-122. https://doi.org/10.5686/jjzwm.24.115

258. Matsunami H, Buck LB (1997) A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals. *Cell* **90**: 775-84. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80537-1

259. Matsutani S, Senba E, Tohyama M (1988) Neuropeptide-and neurotransmitter-related immunoreactivities in the developing rat olfactory bulb. *J Comp Neurol*. **272**(3): 331-342. https://doi.org/10.1002/cne.902720304

260. Mattiacci L, Dicke M, Posthumus MA (1994) Induction of parasitoid attracting synomone in brussels sprouts plants by feeding of *Pieris brassicae larvae*: role of mechanical damage and herbivore elicitor. *J Chem Ecol.* **20**: 2229–2247. https://doi.org/10.1007/BF02033199

261. McCotter RE (1912) The connection of the vomeronasal nerves with the accessory olfactory bulb in the opossum and other animals. *Anat Rec.* **6**: 299–318.

262. McGlone JJ, Garcia A, Rakhshandeh A (2019) Multi-farm analyses indicate a novel boar pheromone improves sow reproductive performance. *Animals*, **9**(2): 37. https://doi.org/10.3390/ani9020037

263. McGowen MR, Clark C, Gatesy J (2008) The Vestigial Olfactory Receptor Subgenome of Odontocete Whales: Phylogenetic Congruence between Gene-Tree

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Reconciliation and Supermatrix Methods. *Syst Biol.* **57**(4): 574–590. https://doi.org/10.1080/10635150802304787

264. McLean JH, Shipley MT (1992) Neuroanatomical substrates of olfaction. In Science of olfaction (pp. 126-171). Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2836-3_5

265. Mechin V, Pageat P, Teruel E, Asproni P (2021) Histological and Immunohistochemical Characterization of Vomeronasal Organ Aging in Mice. *Animals*. **11**(5): 1211. https://doi.org/10.3390/ani11051211

266. Meisami E, Bhatnagar KP (1998) Structure and diversity in mammalian accessory olfactory bulb. *Microsc Res Tech*. **43**(6): 476-499. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19981215)43:6<476::AID-JEMT2>3.0.CO;2-V

267. Meister M (2015) On the dimensionality of odor space. *Elife* **4**: e07865 https://doi.org/10.7554/eLife.07865

268. Melrose DR, Reed HCB, Patterson RLS (1971) Androgen Steroids Associated with Boar Odour as an aid to the Detection of Oestrus in Pig Artificial Insemination. *Br Vet J.* **127**(10): 497-502. https://doi.org/10.1016/S0007-1935(17)37337-2

269. Menco BPM (1992) Ultrastructural studies on membrane, cytoskeletal, mucous, and protective compartments in olfaction. *Microsc Res Tech.* ***22***(3): 215–224. https://doi.org/10.1002/jemt.1070220303

270. Menco BPM (1997) Ultrastructural aspects of olfactory signaling. *Chem Senses*. **22**(3): 295-311. https://doi.org/10.1093/chemse/22.3.295

271. Menco BPM, Carr VM, Ezeh PI, Liman ER, Yankova MP (2001) Ultrastructural localization of G-proteins and the channel protein TRP2 to microvilli of rat vomeronasal receptor cells. *J Comp Neurol*. **438**(4): 468-89. https://doi.org/10.1002/cne.1329

272. Mendoza AS, Kühnel W (1987) Morphological evidence for a direct innervation of the mouse vomeronasal glands. *Cell Tissue Res.* **247**(2): 457–459. https://doi.org/10.1007/BF00218328

273. Meredith M (1994) Chronic recording of vomeronasal pump activation in awake behaving hamsters. *Physiol Behav*. **56**(2): 345-54. https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)90205-4

274. Meredith M, Marques DM, O'Connell RJ, Stern FL (1980) Vomeronasal pump: significance for male hamster sexual behavior. *Science*. **207**(4436): 1224-1226. https://doi.org/10.1126/science.7355286

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

275. Meredith M, O'Connell RJ (1979) Efferent control of stimulus access to the hamster vomeronasal organ. *J Physiol.* **286**(1): 301-316. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1979.sp012620

276. Michael RP, Keverne EB (1970) Primate sex pheromones of vaginal origin. *Nature* **225**: 84–85. https://doi.org/10.1038/225084a0

277. Miodonski R (1968) Bulbus olfactorius of the dog (*Canis familiaris*). *Acta Biol Cracov*. **11**: 65–75.

278. Miyazaki M, Yamashita T, Suzuki Y, Saito Y, Soeta S, Taira H, Suzuki A (2006) A major urinary protein of the domestic cat regulates the production of felinine, a putative pheromone precursor. *Chem Biol.* **13**: 1071-1079. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.08.013

279. Mogi K, Sakurai K, Ichimaru T, Ohkura S, Mori Y, Okamura H (2007) Structure and chemical organization of the accessory olfactory bulb in the goat. *Anat Rec*. **290**: 301–310. https://doi.org/10.1002/ar.20505

280. Mollo E, Garson MJ, Polese G, Amodeo P, Ghiselin MT (2017) Taste and smell in aquatic and terrestrial environments. *Nat Prod Rep.* **34**: 496-513. https://doi.org/10.1039/C7NP00008A

281. Mombaerts P (2004) Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors. *Nat Rev Neurosci*. **5**(4): 263-278. https://doi.org/10.1038/nrn1365

282. Mombaerts P, Wang F, Dulac C, Chao SK, Nemes A, Mendelsohn M, Edmondson J, Axel R (1996) Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* **87**(4): 675–686. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81387-2

283. Monti-Bloch L, Jennings-White C, Berliner D (1998) The human vomeronasal system: a review. *Ann N Y Acad Sci.* **855**(1): 373-389. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb10595.x

284. Mohrhardt J, Nagel M, Fleck D, Ben-Shaul Y, Spehr M (2018) Signal detection and coding in the accessory olfactory system. *Chem Senses*. **43**(9): 667-695. https://doi.org/10.1093/chemse/bjy061

285. Moriya-Ito K, Hayakawa T, Suzuki H, Hagino-Yamagishi K, Nikaido M (2018) Evolution of vomeronasal receptor 1 (V1R) genes in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Gene* **642**: 343-53. https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.11.048

286. Mugnaini E, Oertel WH, Wouterlood FF (1984) Immunocytochemical localization of GABA neurons and dopamine neurons in the rat main and accessory olfactory bulbs. *Neurosci Lett.* **47**(3): 221-226. https://doi.org/10.1016/0304-3940(84)90517-2

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

287. Müller CA, Manser MB (2008) Scent-marking and intrasexual competition in a cooperative carnivore with low reproductive skew. *Ethology* **114**: 174-185. https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.2007.01455.x

288. Müller-Schwarze D (1971) Pheromones in black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*). *Anim Behav.* **19**: 141-152. https://doi.org/10.1016/S0003-3472(71)80149-5

289. Müller-Schwarze D, Müller-Schwarze S, Singer AG, Silverstein RM (1974) Mammalian. Pheromone: Identification of Active Component in the Subauricular Scent of the Male Pronghorn. *Science* **183**: 860-862. https://doi.org/10.1126/science.183.4127.860

290. Munger SD, Leinders-Zufall T, Zufall F (2009) Subsystem Organization of the Mammalian Sense of Smell. *Annu Rev Physiol.* **71**: 115-140. https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100608

291. Murphy MR, Schneider GE (1970) Olfactory Bulb Removal Eliminates Mating Behavior in the Male Golden Hamster. *Science* **162**: 302-304. https://doi.org/10.1126/science.167.3916.302

292. Nacher J, Crespo C, McEwen BS (2001) Doublecortin expression in the adult rat telencephalon. *Eur J Neurosci*. **14**(4): 629-44. https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01683.x

293. Nadi NS, Hirsch JD, Margolis FL (1980) Laminar distribution of putative neurotransmitter amino acids and ligand binding sites in the dog olfactory bulb. *J Neurochem*. **34**: 138–146. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1980.tb04632.x

294. Nagashima A, Touhara K (2010) Enzymatic Conversion of Odorants in Nasal Mucus Affects Olfactory Glomerular Activation Patterns and Odor Perception. *J Neurosci*. **30**(48): 16391-16398. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2527-10.2010

295. Nakajima T, Sakaue M, Kato M, Saito S, Ogawa K, Taniguchi K (1998) Immunohistochemical and enzyme-histochemical study on the accessory olfactory bulb of the dog. *Anat Rec*. **252**: 393–402. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199811)252:3<393::AID-AR7>3.0.CO;2-T

296. Nakajima M, Tsuruta M, Mori H, Nishikawa C, Okuyama S, Furukawa Y (2013) A comparative study of axon-surrounding cells in the two nasal nerve tracts from mouse olfactory epithelium and vomeronasal organ. *Brain Res*. **1503**, 16–23. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.01.053

297. Nakamuta S, Nakamuta N, Taniguchi K, Taniguchi K (2012) Histological and ultrastructural characteristics of the primordial vomeronasal organ in lungfish. *Anat Rec.* **295**(3): 481-91. https://doi.org/10.1002/ar.22415

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

298. Nakamuta S, Yamamoto Y, Miyazaki M, Sakuma A, Nikaido M, Nakamuta N (2023) Type 1 vomeronasal receptors expressed in the olfactory organs of two African lungfish, *Protopterus annectens* and *Protopterus amphibius*. *J Comp Neurol*. **531**(1): 116-131. https://doi.org/10.1002/cne.25416

299. Ngwenya A, Patzke N, Ihunwo AO, Manger PR (2011) Organisation and chemical neuroanatomy of the African elephant (*Loxodonta africana*) olfactory bulb. *Brain Struct Funct*. **216**: 403–416. https://doi.org/10.1007/s00429-011-0316-y

300. Nordlund DA, Lewis WJ (1976) Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. *J Chem Ecol.* **2**: 211–220. https://doi.org/10.1007/BF00987744

301. Novotny M, Harvey S, Jemiolo B, Alberts J (1985) Synthetic pheromones that promote inter-male aggression in mice. *PNAS* **82**: 2059-2061. https://doi.org/10.1073/pnas.82.7.2059

302. Oboti L, Ibarra-Soria X, Pérez-Gómez A, Schmid A, Pyrski M, Paschek N, Kircher S, Logan DW, Leinders-Zufall T, Zufall F, Chamero P (2015) Pregnancy and estrogen enhance neural progenitor-cell proliferation in the vomeronasal sensory epithelium. *BMC Biol.* **13**(1): 1-17. https://doi.org/10.1186/s12915-015-0211-8

303. Ogura T, Krosnowski K, Zhang L, Bekkerman M, Lin W (2010) Chemoreception Regulates Chemical Access to Mouse Vomeronasal Organ: Role of Solitary Chemosensory Cells. *PLoS One* **5**(7): e11924. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011924

304. Oikawa T, Shimamura K, Saito TR, Taniguchi K (1993) Fine Structure of the Vomeronasal Organ in the House Musk Shrew (*Suncus murinus*). *Exp Anim*. **42**(3): 411-419. https://doi.org/10.1538/expanim1978.42.3_411

305. Oikawa T, Shimamura K, Saito TR, Taniguchi K (1994) Fine structure of the vomeronasal organ in the chinchilla (*Chinchilla laniger*). *Exp Anim.* **43**(4): 487-497. https://doi.org/10.1538/expanim1978.43.4_487

306. Orechio D, Aguiar BA, Diniz GB, Bittencourt JC, Haemmerle CAS, Watanabe IS, Miglino MA, Castelucci P (2018) Morphological and cellular characterization of the fetal canine (*Canis lupus familiaris*) subventricular zone, rostral migratory stream, and olfactory bulb. *Anat Rec*. **301**: 1570–1584. https://doi.org/10.1002/ar.23855

307. O'Riain MJ, Bennett NC, Brotherton PNM, McIlrath GM, Clutton-Brock TH (2000) Reproductive suppression and inbreeding avoidance in wild populations of co-operatively breeding meerkats (*Suricata suricatta*). *Behav Ecol Sociobiol*. **48**(6): 471-477. https://doi.org/10.1007/s002650000249

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

308. Ortiz-Leal I, Torres MV, Vargas-Barroso V, Fidalgo LE, López-Beceiro AM, Larriva-Sahd JA, Sánchez-Quinteiro P (2023) The olfactory limbus of the red fox (*Vulpes vulpes*). New insights regarding a noncanonical olfactory bulb pathway. *Front Neuroanat*. **16**: 1097467. https://doi.org/10.3389/fnana.2022.1097467

309. Ortiz-Leal I, Torres MV, Villamayor PR, Fidalgo LE, López-Beceiro A, Sanchez-Quinteiro P (2022) Can domestication shape canidae brain morphology? The accessory olfactory bulb of the red fox as a case in point. *Ann Anat*. **240**: 151881. https://doi.org/10.1016/j.aanat.2021.151881

310. Ortiz-Leal I, Torres MV, Villamayor PR, López-Beceiro A, Sánchez-Quinteiro P (2020) The vomeronasal organ of wild canids: the fox (Vulpes vulpes) as a model. *J Anat.* **237**(5): 890-906. https://doi.org/10.1111/joa.13254

311. Pageat P, Gaultier E (2003) Current research in canine and feline pheromones. *Vet Clin NorthAm SmallAnim Pract*. **33**: 187–211. https://doi.org/10.1016/S0195-5616(02)00128-6

312. Papes F, Logan DW, Stowers L (2010) The vomeronasal organ mediates interspecies defensive behaviors through detection of protein pheromone homologs. *Cell* **141**(4): 692-703. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.037

313. Pardo-Bellver, C., Cádiz-Moretti, B., Novejarque, A., Martínez-García, F., & Lanuza, E. (2012). Differential efferent projections of the anterior, posteroventral, and posterodorsal subdivisions of the medial amygdala in mice. *Front Neuroanat*. **6**: 33. https://doi.org/10.3389/fnana.2012.00033

314. Pardo-Bellver C, Vila-Martin ME, Martínez-Bellver S, Villafranca-Faus M, Teruel-Sanchis A, Savarelli-Balsamo CA, Drabik SM, Martínez-Ricós J, Cervera-Ferri A, Martínez-García F, Lanuza E, Teruel-Martí V (2022) Neural activity patterns in the chemosensory network encoding vomeronasal and olfactory information in mice. *Front Neuroanat*. **16**: 988015. https://doi.org/10.3389/fnana.2022.988015

315. Park C, Ahn M, Lee JY, Lee S, Yun Y, Lim YK, Taniguchi K, Shin T (2014) A morphological study of the vomeronasal organ and the accessory olfactory bulb in the Korean roe deer, *Capreolus pygargus*. *Acta Histochem.* **116**(1): 258-264. https://doi.org/10.1016/j.acthis.2013.08.003

316. Park C, Yang W, Bae Y, Lee Y, Kang W, Ahn M, Shin T (2013) A morphological study of vomeronasal organ of Korean black goat (*Capra aegagrus hircus*). *Korean J Vet Res*. **53**(1): 55-60. https://doi.org/10.14405/kjvr.2013.53.1.055

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

317. Park J, Lee W, Jeong C, Kim H, Taniguchi K, Shin T (2012) Developmental changes affecting lectin binding in the vomeronasal organ of domestic pigs, *Sus scrofa*. *Acta Histochem*. **114**(1): 24-30. https://doi.org/10.1016/j.acthis.2011.02.001

318. Parsons TS (1959) Studies on the comparative embryology of the reptilian nose. *Bull Mus Comp Zool Harvard College* **120**: 101- 277.

319. Parsons TS (1967) Evolution of the nasal structures in the lower tetrapods. *Am Zool.* **7**(3): 397-413. https://doi.org/10.1093/icb/7.3.397

320. Pasteels JM (1982) Is kairomone a valid and useful term? *J Chem Ecol*. **8**(7): 1079–1081. https://doi.org/10.1007/bf00987889

321. Pastor LM, Frutos MJ, Grana L, Ramos D, Gallego-Huidobro J, Calvo A (1992) Histochemical study of glycoconjugates in the nasal mucosa of the rat and guinea pig. *Histochem J*. **24**: 727–736. https://doi.org/10.1007/BF01460825

322. Pernaa J, Aksela M (2011) Learning Organic Chemistry through a Study of Semiochemicals. *J Chem Educ.* **88**: 1644–1647. https://doi.org/10.1021/ed900050g

323. Peters BP, Goldstein IJ (1979) The use of fluorescein-conjugated Bandeiraea simplicifolia B4-isolectin as a histochemical reagent for the detection of alpha-D-galactopyranosyl groups. Their occurrence in basement membranes. *Exp Cell Res*. **120**: 321–334. https://doi.org/10.1016/0014-4827(79)90392-6

324. Piana GP (1882) Contribuzioni alla conoscenza della strutture e della funzione dell' organo di Jacobson. Bologna 1880. Deusch. Zeitsch. f. Tiermedizin, Bd. 7, s. **325**.

325. Pietras RJ (1981) Sex pheromone production by preputial gland: the regulatory role of estrogen. *Chemical Senses* **6**: 391–408. https://doi.org/10.1093/chemse/6.4.391

326. Pihlström H (2008) Comparative anatomy and physiology of chemical senses in aquatic mammals. Sensory Evolution on the Threshold. Adaptations in Secondarily Aquatic Vertebrates. https://doi.org/10.1525/9780520934122

327. Pillay S, Bhagwandin A, Bertelsen MF, Patzke N, Engler G, Engel AK, Manger PR (2017) Regional distribution of cholinergic, catecholaminergic, serotonergic and orexinergic neurons in the brain of two carnivore species: The feliform banded mongoose (*Mungos mungo*) and the caniform domestic ferret (*Mustela putorius furo*). *J Chem Neuroanat*. **82**: 12–28. https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2017.04.001

328. Placyk JS, Graves BM (2002) Prey detection by vomeronasal chemoreception in a plethodontid salamander. *J Chem Ecol.* **28**: 1017–1036. https://doi.org/10.1023/A:1015213918739

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

329. Plendl J, Sinowatz F (1998) Glycobiology of the Olfactory System. *Cells Tissues Organs*. **161**(1-4): 234-253. https://doi.org/10.1159/000046461

330. Poran NS (1998) Vomeronasal organ and its associated structures in the opossum *Monodelphis domestica*. *Microsc Res Tech*. **43**(6): 500-510. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19981215)43:6<500::AID-JEMT3>3.0.CO;2-H

331. Porteros A, Arévalo R, Crespo C, García-Ojeda E, Briñón JG, Aijón J, Alonso JR (1995) Calbindin D-28k immunoreactivity in the rat accessory olfactory bulb. *Brain Res*. **689**: 93–100. https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00547-4

332. Powers JB, Winans SS (1975) Vomeronasal organ: critical role in mediating sexual behavior of the male hamster. *Science* **187**: 961-963. https://doi.org/10.1126/science.1145182

333. Price JL (1985) Beyond the primary olfactory cortex: olfactory-related areas in the neocortex, thalamus and hypothalamus, *Chem Senses*. **10**(2): 239–258. https://doi.org/10.1093/chemse/10.2.239

334. Price JL, Powell TP (1971) Certain observations on the olfactory pathway. *J Anat.* **110**(1): 105–126.

335. Pro-Sistiaga P, Mohedano-Moriano A, Ubeda-Bañon I, Arroyo-Jimenez MM, Marcos P, Artacho-Pérula E, Crespo C, Insausti R, Martinez-Marcos A (2007) Convergence of olfactory and vomeronasal projections in the rat basal telencephalon. *J Comp Neurol*. **504**: 346-62. https://doi.org/10.1002/cne.21455

336. Raisman G (1972) An experimental study of the projection of the amygdala to the accessory olfactory bulb and its relationship to the concept of a dual olfactory system. *Exp Brain Res*. **14**(4): 395-408. https://doi.org/10.1007/BF00235035

337. Rall W, Shepherd GM, Reese TS, Brightman MW (1966) Dendrodendritic synaptic pathway for inhibition in the olfactory bulb. *Exp Neurol*. **14**(1): 44-56. https://doi.org/10.1016/0014-4886(66)90023-9

338. Ramakers GJ, Verhaagen J, Oestreicher AB, Margolis FL, van Bergen en Henegouwen PM, Gispen WH (1992) Immunolocalization of B-50 (GAP-43) in the mouse olfactory bulb: Predominant presence in preterminal axons. *J Neurocytol*. **21**: 853–869. https://doi.org/10.1007/BF01191683

339. Rasmussen LEL, Lazar J, Greenwood DR (2003) Olfactory adventures of elephantine pheromones. *Biochem Soc Trans.* **31**: 137–141. https://doi.org/10.1042/bst0310137

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

340. Reinecke A, Ruther J, Mayer CJ, Hilker M (2006) Optimized trap lure for male Melolontha cockchafers. *J Appl Entomol.* **130**: 171- 176. https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2006.01041.x

341. Reinecke A, Ruther J, Tolasch T, Francke W, Hilker M (2002) Alcoholism in cockchafers: orientation of male Melolontha melolontha towards green leaf alcohols. *Naturwissenschaften* **89**: 265–269. https://doi.org/10.1007/s00114-002-0314-2

342. Reiss JO, Eisthen HL (2008) Comparative anatomy and physiology of chemical senses in amphibians. Sensory Evolution on the Threshold: Adaptations in Secondarily Aquatic Vertebrates. *California Scholarship Online* https://doi.org/10.1525/california/9780520252783.003.0004

343. Rekwot PI, Ogwu D, Oyedipe EO, Sekoni VO (2001) The role of pheromones and biostimulation in animal reproduction. *Anim Reprod Sci*. **65**(3-4): 157-170. https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00223-2

344. Ressler KJ, Sullivan SL, Buck LB (1993) A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium.*Cell* **73**: 597-609. https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90145-g

345. Retzius G (1894) Die Riechzellen der Ophidier in der Riechochleimhaut und im Jacobson'schen Organ. *Biol Untersuch. Neue Folge.* **6**: 48-51.

346. Richardson HN, Nelson AL, Ahmed EI, Parfitt DB, Romeo RD, Sisk CL (2004) Female pheromones stimulate release of luteinizing hormone and testosterone without altering GnRH mRNA in adult male Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Gen Comp Endocrinol*. **138**(3): 211-217. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2004.06.008

347. Riddell P, Paris MCJ, Joonè CJ, Pageat P, Paris DBBP (2021) Appeasing pheromones for the management of stress and aggression during conservation of wild canids: Could the solution be right under our nose? *Animals*. **11**: 1574. https://doi.org/10.3390/ani11061574

348. Rivard G, Klemm WR (1989) Two body fluids containing bovine estrous pheromone(s). *Chem Senses* **14**: 273–279. https://doi.org/10.1093/chemse/14.2.273

349. Riviere S, Challet L, Fluegge D, Spehr M, Rodriguez I (2009) Formyl peptide receptor-like proteins are a novel family of vomeronasal chemosensors. *Nature* **459**: 574–577. https://doi.org/10.1038/nature08029

350. Rodewald A, Gisder D, Gebhart VM, Oehring H, Jirikowski GF (2016) Distribution of olfactory marker protein in the rat vomeronasal organ. *J Chem Neuroanat*. **77**: 19-23. https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2016.04.002

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

351. Rodolfo-Masera T (1943) Su l'esistenza di un particolare organo olfattivo nel setto nasale della cavia e di altri roditori. *Arch Ital Anat Embriol.* **48**: 157-213.

352. Rodriguez I, Greer CA, Mok MY, Mombaerts P (2000) A putative pheromone receptor gene expressed in human olfactory mucosa. *Nat Genet.* **26**:18–19. https://doi.org/10.1038/79124

353. Roslinski DL, Bhatnagar KP, Burrows AM, Smith TD (2000) Comparative morphology and histochemistry of glands associated with the vomeronasal organ in humans, mouse lemurs, and voles. *Anat Rec*. **260**: 92–101. https://doi.org/10.1002/1097-0185(20000901)260:1<92::AID-AR100>3.0.CO;2-%23

354. Ruther J, Meiners T, Steidle JLM (2002) Rich in phenomena-lacking in terms. A classification of kairomones. *Chemoecology* **12**: 161–167. https://doi.org/10.1007/PL00012664

355. Ruysch F (1703) Thesaurus Anatomicus Tertius. *Amstelaedami: Joannen Wolters*. p48–49.

356. Ryba NJP, Tirindelli R (1997) A new multigene family of putative pheromone receptors. *Neuron.* **19**(2): 371-379. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80946-0

357. Salazar I, Barber PC, Cifuentes JM (1992) Anatomical and immunohistological demonstration of the primary neural connections of the vomeronasal organ in the dog. *Anat Rec*. **233**: 309–313. https://doi.org/10.1002/ar.1092330214

358. Salazar I, Barrios AW, Sánchez-Quinteiro P (2016) Revisiting the vomeronasal system from an integrated perspective. *Anat Rec*. **299**(11): 1488-1491. https://doi.org/10.1002/ar.23470

359. Salazar I, Cifuentes JM, Sánchez-Quinteiro P (2013) Morphological and immunohistochemical features of the vomeronasal system in dogs. *Anat Rec.* **296**: 146-55. https://doi.org/10.1002/ar.22617

360. Salazar I, Cifuentes JM, Sánchez-Quinteiro P, Caballero TG (1994) Structural, morphometric, and immunohistological study of the accessory olfactory bulb in the dog. *Anat Rec*. **240**(2): 277-285. https://doi.org/10.1002/ar.1092400216

361. Salazar I, Lombardero M, Alemañ N, Sánchez-Quinteiro P (2003) Development of the vomeronasal receptor epithelium and the accessory olfactory bulb in sheep. *Microsc Res Tech*. **61**(5): 438-447. https://doi.org/10.1002/jemt.10362

362. Salazar I, Lombardero M, Sánchez-Quinteiro P, Roel P, Cifuentes JM (1998) Origin and regional distribution of the arterial vessels of the vomeronasal organ in the sheep.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A methodological investigation with scanning electron microscopy and cutting-grinding technique. *Ann Anat*. **180**(2): 181-187. https://doi.org/10.1016/S0940-9602(98)80023-X

363. Salazar I, Sánchez-Quinteiro P (1998) Supporting tissue and vasculature of the mammalian vomeronasal organ: the rat as a model. *Microsc Res Tech.* **41**: 492-505. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19980615)41:6<492::AID-JEMT5>3.0.CO;2-P

364. Salazar I, Sánchez-Quinteiro P (2003) Differential development of binding sites for four lectins in the vomeronasal system of juvenile mouse: from the sensory transduction site to the first relay stage. *Brain Res.* **979**(1–2): 15-26. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)02835-X

365. Salazar I, Sánchez-Quinteiro P (2009) The risk of extrapolation in neuroanatomy: the case of the Mammalian vomeronasal system. *Front Neuroanat*. **3**: 22. https://doi.org/10.3389/neuro.05.022.2009

366. Salazar I, Sánchez-Quinteiro P (2011) A detailed morphological study of the vomeronasal organ and the accessory olfactory bulb of cats. *Microsc Res Tech*. **74**(12): 1109-1120. https://doi.org/10.1002/jemt.21002

367. Salazar I, Sánchez-Quinteiro P, Alemañ N, Cifuentes JM, Fernandez De Trocóniz P (2007) Diversity of the vomeronasal system in mammals: the singularities of the sheep model. *Microsc Res Tech.* **70**(8): 752-762. https://doi.org/10.1002/jemt.20461

368. Salazar I, Sánchez-Quinteiro P, Alemañ N, Prieto D (2008) Anatomical, immunohistochemical and physiological characteristics of the vomeronasal vessels in cows and their possible role in vomeronasal reception. *J Anat.* **212**(5): 686-696. https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2008.00889.x

369. Salazar I, Sánchez-Quinteiro P, Cifuentes JM (1995) Comparative anatomy of the vomeronasal cartilage in mammals: mink, cat, dog, pig, cow and horse. *Ann Anat.* **177**(5): 475–481. https://doi.org/10.1016/s0940-9602(11)80156-1

370. Salazar I, Sánchez-Quinteiro P, Cifuentes JM (1997b) The soft-tissue components of the vomeronasal organ in pigs, cows and horses. *Anat Hist Embryol.* **26**(3): 179-186. https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.1997.tb00122.x

371. Salazar I, Sánchez-Quinteiro P, Cifuentes JM, Caballero TG (1996) The vomeronasal organ of the cat. *J Anat.* **188**(Pt 2): 445-454.

372. Salazar I, Sánchez-Quinteiro P, Cifuentes JM, Fernandez De Trocóniz P (2006) General organization of the perinatal and adult accessory olfactory bulb in mice. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* **288**(9): 1009–1025. https://doi.org/10.1002/ar.a.20366

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

373. Salazar I, Sánchez-Quinteiro P, Cifuentes JM, Fernandez De Trocóniz P , Lombardero M (1997a) Distribution of the arterial supply to the vomeronasal organ in the cat. *Anat Rec.* **247**(1): 129–136. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199701)247:1<129::AID-AR15>3.0.CO;2-R

374. Salazar I, Sánchez Quinteiro P, Lombardero M, Aleman N, Fernández de Trocóniz P (2004) The prenatal maturity of the accessory olfactory bulb in pigs. *Chem Senses*. **29**(1): 3-11. https://doi.org/10.1093/chemse/bjh001

375. Salazar I, Sánchez-Quinteiro P, Lombardero M, Cifuentes JM (2000) A descriptive and comparative lectin histochemical study of the vomeronasal system in pigs and sheep. *J Anat*. **196**(1): 15-22. https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2000.19610015.x

376. Salazar I, Sánchez-Quinteiro P, Lombardero M, Cifuentes JM (2001) Histochemical identification of carbohydrate moieties in the accessory olfactory bulb of the mouse using a panel of lectins. *Chem Senses*. **26**(6): 645-652. https://doi.org/10.1093/chemse/26.6.645

377. Sankarganesh D, Kirkwood RN, Meillour NL, Angayarkanni J, Achiraman S, Archunan G (2022) Pheromones, binding proteins, and olfactory systems in the pig (*Sus scrofa*): An updated review. *Front Vet Sci*. **9**: 989409. https://doi.org/10.3389/fvets.2022.989409

378. Sánchez-Villagra MR (2001) Ontogenetic and phylogenetic transformations of the vomeronasal complex and nasal floor elements in marsupial mammals. *Zool J Linnean Soc.* **131**(4): 459–79. https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2001.tb01322.x

379. Saraiva LR, Ahuja G, Ivandic I, Syed AS, Marioni JC (2015) Molecular and neuronal homology between the olfactory systems of zebrafish and mouse. *Sci Rep.* **5**: 11487. https://doi.org/10.1038/srep11487

380. Sasuga S, Hidaka S, Ohkura S, Okamura H, Osada T (2013) Gene expression of bovine vomeronasal receptors. *J Biol Sci*. **7**: 27-42.

381. Sbarbati A, Osculati F (2006) Allelochemical Communication in Vertebrates: Kairomones, Allomones and Synomones. *Cells Tissues Organs* **183**: 206–219. https://doi.org/10.1159/000096511

382. Scalia F, Winans SS (1975) The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *J Comp Neurol*. **161**(1): 31-55. https://doi.org/10.1002/cne.901610105

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

383. Schaal B, Coureaud G, Langlois D, Ginies C, Sémon E, Perrier G (2003) Chemical and behavioural characterization of the rabbit mammary pheromone. *Nature* **424**: 68-72. https://doi.org/10.1038/nature01739

384. Scheiber IB, Weiß BM, Kingma SA, Komdeur J (2017) The importance of the altricial–precocial spectrum for social complexity in mammals and birds–a review. *Front Zool*. **14**(1): 1-20. https://doi.org/10.1186/s12983-016-0185-6

385. Schneider NY (2011) The development of the olfactory organs in newly hatched monotremes and neonate marsupials. *J Anat.* **219**(2): 229-242. https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2011.01393.x

386. Schneider NY, Fletcher TP, Shaw G, Renfree MB (2008) The vomeronasal organ of the tammar wallaby. *J Anat.* **213**(2): 93-105. https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2008.00933.x

387. Schneider NY, Fletcher TP, Shaw G, Renfree MB (2012) Goα expression in the vomeronasal organ and olfactory bulb of the tammar wallaby. *Chem Senses*. **37**(6): 567-577. https://doi.org/10.1093/chemse/bjs040

388. Schoenfeld TA, McKerracher L, Obar R, Vallee RB (1989) MAP 1A and MAP 1B are structurally related microtubule associated proteins with distinct developmental patterns in the CNS. *J Neurosci*. **9**: 1712–1730. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.09-05-01712.1989

389. Schoeppner NM, Relyea RA (2005) Damage, digestion, and defence: the roles of alarm cues and kairomones for inducing prey defences. *Ecol Lett.* **8**: 505-512. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00744.x

390. Schonewolf KW, Bell R, Rypstra AL, Persons MH (2006) Field Evidence of an Airborne Enemy-Avoidance Kairomone in Wolf Spiders. *J Chem Ecol.* **32**: 1565–1576. https://doi.org/10.1007/s10886-006-9070-7

391. Schröder H, Moser N, Huggenberger S (2020) The mouse olfactory system. In Neuroanatomy of the Mouse; Springer: Cham, Switzerland. https://doi.org/10.1007/978-3-030-19898-5_14

392. Schultze-Westrum T (1965) Innerartliche verstandigung durch dufte beim gleitbeutler *Petaurus breviceps papuanus* (Marsupialia, Phalangeridae). *Z Vgl Physiol.* **50**: 151-220. https://doi.org/10.1007/BF00302702

393. Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW (1989) Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature*. **338**: 161–164.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

394. Schwenk K (1995) Of tongues and noses: chemoreception in lizards and snakes. *Trends Ecol Evol.* **10**(1): 7-12. https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)88953-3

395. Schwob JE, Price JL (1984) The development of axonal connections in the central olfactory system of rats. *J Comp Neurol.* **223**: 177–202. https://doi.org/10.1002/cne.902230204

396. Segovia S, Orensanz LM, Valencia A, Guillamón A (1984) Effects of sex steroids on the development of the accessory olfactory bulb in the rat: a volumetric study. *Dev Brain Res.* **16**(2): 312-314. https://doi.org/10.1016/0165-3806(84)90036-1

397. Seitz E (1969) Die bedeutung geruchlicher orientierung beim plumplori *Nycticebus coucang* (Prosimii, Lorisidae). *Z. Tierpsychol* **26**: 73-103. https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.1969.tb01938.x

398. Shapiro LS, Halpern M, Ee PL (1995) Lectin histochemical identification of carbohydrate moieties in opossum chemosensory systems during development, with special emphasis on VVA-identified subdivisions in the accessory olfactory bulb. *J Morphol*. **224**(3): 331-349. https://doi.org/10.1002/jmor.1052240307

399. Shapiro LS, Roland RM, Halpern M (1997) Development of olfactory marker protein and N-CAM expression in chemosensory systems of the opossum, *Monodelphis domestica*. *J Morphol*. **234**(2), 109-129. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4687(199711)234:2<109::AID-JMOR1>3.0.CO;2-7

400. Shi P, Zhang J (2007) Comparative genomic analysis identifies an evolutionary shift of vomeronasal receptor gene repertoires in the vertebrate transition from water to land. *Genome Res.* **17**(2): 166-174. https://doi.org/10.1101/gr.6040007

401. Shin T, Kim J, Choi Y, Ahn M (2017) Glycan diversity in the vomeronasal organ of the Korean roe deer, *Capreolus pygargus*: A lectin histochemical study. *Acta Histochem*. **119**(8): 778-785. https://doi.org/10.1016/j.acthis.2017.10.001

402. Shinoda K, Shiotani Y, Osawa Y (1989) "Necklace olfactory glomeruli" form unique components of the rat primary olfactory system. *J Comp Neurol.* **284**: 362–373. https://doi.org/10.1002/cne.902840304

403. Shinoda K, Ohtsuki T, Nagano M, Okumura T (1993) A possible functional necklace formed by placental antigen X-P2immunoreactive and intensely acetylcholinesterase-reactive (PAX/IAE) glomerular complexes in the rat olfactory bulb. *Brain Res*. **618**: 160–166. https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90440-X

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

404. Shinohara H, Asano T, Kato K (1992) Differential localization of G-proteins Gi and Go in the accessory olfactory bulb of the rat. *J Neurosci.* **4**: 1275-79. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1204-01275.1992

405. Shipley MT, Adamek GD (1984) The connections of the mouse olfactory bulb: a study using orthograde and retrograde transport of wheat germ agglutinin conjugated to horseradish peroxidase. *Brain Res Bull*. **12**(6): 669-688. https://doi.org/10.1016/0361-9230(84)90148-5

406. Shnayder L, Schwanzel-Fukuda M, Halpern M (1993) Differential OMP expression in opossum accessory olfactory bulb. *Neuroreport*. **5**: 193–196. https://doi.org/10.1097/00001756-199312000-00001

407. Singer AG, Agosta WC, O'Connell RJ, Pfaffmann C, Bowen DV, Field FH (1976) Dimethyl Disulfide: An Attractant Pheromone in Hamster Vaginal Secretion. *Science* **191**: 948-950. https://doi.org/10.1126/science.1251205

408. Silva L, Antunes A (2017) Vomeronasal Receptors in Vertebrates and the Evolution of Pheromones Detection. *Annu Rev Anim Biosci.* **5**: 353-370. https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022516-022801

409. Silver WL, Moulton DG (1982) Chemosensitivity of rat nasal trigeminal receptors. *Physiol Behav.* **28**(5): 927-31. https://doi.org/10.1016/0031-9384(82)90216-5

410. Siracusa C, Manteca X, Cuenca R, del Mar Alcalá M, Alba A, Lavín S, Pastor J (2010) Effect of a synthetic appeasing pheromone on behavioral, neuroendocrine, immune, and acute-phase perioperative stress responses in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* **237**(6): 673-681. https://doi.org/10.2460/javma.237.6.673

411. Skeen LC, Hall WC (1977) Efferent projections of the main and the accessory olfactory bulb in the tree shrew (*Tupaia glis*). *J Comp Neurol*. **172**: 1–35.

412. Smith J, Hurst JL, Barnard CJ (1994) Comparing behaviour in wild and laboratory strains of the house mouse: levels of comparison and functional inference. *Behav processes*. **32**(1): 79-86. https://doi.org/10.1016/0376-6357(94)90029-9

413. Smith TD, Bhatnagar KP, Dennis JC, Morrison EE, Park TJ (2007) Growth-deficient vomeronasal organs in the naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*). *Brain Res.* **1132**(1): 78–83. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.11.021

414. Smith TD, Bhatnagar KP, Shimp KL, Kinzinger JH, Bonar CJ, Burrows AM, Mooney MP, Siegel MI (2002) Histological definition of the vomeronasal organ in humans and chimpanzees, with a comparison to other primates. *Anat Rec.* **267**(2): 166-176. https://doi.org/10.1002/ar.10095

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

415. Smith TD, Eiting TP, Bhatnagar KP (2015) Anatomy of the nasal passages in mammals. *Handbook of olfaction and gustation*, 37-62. https://doi.org/10.1002/9781118971758.ch2

416. Smith TD, Garrett EC, Bhatnagar KP, Bonar CJ, Bruening AE, Dennis JC, Kinznger JH, Johnson EW, Morrison EE (2011) The vomeronasal organ of New World monkeys (Platyrrhini). *Anat Rec.* **294**(12): 2158-78. https://doi.org/10.1002/ar.21509

417. Smith TD, Laitman JT, Bhatnagar KP (2014) The Shrinking Anthropoid Nose, the Human Vomeronasal Organ, and the Language of Anatomical Reduction. *Anat Rec.* **297**(11): 2196-2204. https://doi.org/10.1002/ar.23035

418. Smith TD, Siegel MI, Bonar CJ, Bhatnagar KP, Mooney MP, Burrows AM, Smith MA, Maico LM (2001) The existence of the vomeronasal organ in postnatal chimpanzees and evidence for its homology with that of humans. *J Anat.* **198**(1): 77-82. https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2001.19810077.x

419. Smithson LJ, Kawaja MD (2009) A comparative examination of biomarkers for olfactory ensheathing cells in cats and guinea pigs. *Brain Res*. **1284**: 41–53. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.06.011

420. Sohn J, Orosco L, Guo F, Chung SH, Bannerman P, Mills Ko E, Zarbalis K, Deng W, Pleasure D (2015) The subventricular zone continues to generate corpus callosum and rostral migratory stream astroglia in normal adult mice. *J Neurosci*. **35**: 3756–3763. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3454-14.2015

421. Spehr M, Kelliher KR, Li XH, Boehm T, Leinders-Zufall T, Zufall F (2006) Essential role of the main olfactory system in social recognition of major histocompatibility complex peptide ligands. *J Neurosci*. **26**(7): 1961-1970. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4939-05.2006

422. Spicer SS, Schulte BA, Thomopoulos GN (1983) Histochemical properties of the respiratory tract epithelium in different species. *Am Rev Respir Dis*. **128**: S20–S26.

423. Stefańczyk-Krzymowska S, Krzymowski T, Wąsowska B, Jana B, Słomiński J (2003) Intramuscular injections of male pheromone 5α-androstenol change the secretory ovarian function in gilts during sexual maturation. *Reprod Biol.* **3**: 241-57.

424. Stephan H (1965) Der Bulbus olfactorius accessorius bei Insektivoren und Primaten. *Acta Anat (Basel)*. **62**(2): 215-253. https://doi.org/10.1159/000142750

425. Stevens M (2013) 'Sensing the World', Sensory Ecology, Behaviour, and Evolution (Oxford, 2013; online edn, Oxford Academic, 17 Dec. 2013). https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199601776.003.0002

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

426. Storan MJ, Key B (2006) Septal organ of Grüneberg is part of the olfactory system. *J Comp Neurol.* **494**(5): 834-844. https://doi.org/10.1002/cne.20858

427. Stowe MK, Turlings TC, Loughrin JH, Lewis WJ, Tumlinson JH (1995) The chemistry of eavesdropping, alarm, and deceit. *PNAS* **92**: 23-28. https://doi.org/10.1073/pnas.92.1.23

428. Stowers L, Liberles SD (2016) State-dependent responses to sex pheromones in mouse. *Curr Opin Neurobiol*. **38**: 74–79. https://doi.org/10.1016/j.conb.2016.04.001

429. Stumpf P, Künzle H, Welsch U (2004) Cutaneous eccrine glands of the foot pads of the small Madagascan tenrec (*Echinopstelfairi*, Insectivora, Tenrecidae): skin glands in a primitive mammal. *Cell Tissue Res.* **315**: 59–70. https://doi.org/10.1007/s00441-003-0815-0

430. Suárez R, Mpodozis J (2009) Heterogeneities of size and sexual dimorphism between the subdomains of the lateral-innervated accessory olfactory bulb (AOB) of *Octodon degus* (Rodentia: Hystricognathi). *Behav Brain Res.* **198**: 306-312. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.11.009

431. Suárez R, Santibáñez R, Parra D, Coppi AA, Abrahão LMB, Sasahara THC, Mpodozis J (2011) Shared and differential traits in the accessory olfactory bulb of caviomorph rodents with particular reference to the semiaquatic capybara. *J Anat.* **218**(5): 558-565. https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2011.01357.x

432. Sugai T, Sugitani M, Onoda N (1997) Subdivisions of the guinea-pig accessory olfactory bulb revealed by the combined method with immunohistochemistry, electrophysiological, and optical recordings. *Neurosci*. **79**(3): 871-885. https://doi.org/10.1016/S0306-4522(96)00690-2

433. Sun L, Müller-Schwarze D (1997) Sibling recognition in the beaver: a field test for phenotype matching. *Anim Behav.* **54**: 493-502. https://doi.org/10.1006/anbe.1996.0440

434. Surov AV, Maltsev AN (2016) Analysis of Chemical Communication in Mammals: Zoological and Ecological Aspects. *Biol Bull.* **43**: 1175–1183. https://doi.org/10.1134/S1062359016110157

435. Suzuki H, Nishida H, Kondo H, Yoda R, Iwata T, Nakayama K, Enomoto T, Wu J, Moriya-Ito K, Miyazaki M, Wakabayashi Y, Kishida T, Okabe M, Suzuki Y, Ito T, Hirota J, Nikaido M (2018) A single pheromone receptor gene conserved across 400 million years of vertebrate evolution. *Mol Biol Evol*. **35**(12): 2928–2939. https://doi.org/10.1093/molbev/msy186

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

436. Swaney WT, Keverne EB (2009) The evolution of pheromonal communication. *Behav Brain Res.* **200**(2): 239-247. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.09.039

437. Sweet G (1904) Contributions to our knowledge of the anatomy of *Notoryctes typhlops*, Stirling. Parts I and II. *Proc R Soc Victoria.* **17**: 76–111. https://doi.org/10.1242/jcs.s2-50.200.547

438. Switzer III RC, Johnson JI, Kirsch JA (1980). Phylogeny through brain traits. Relation of lateral olfactory tract fibers to the accessory olfactory formation as a palimpsest of mammalian descent. *Brain Behav Evol*. **17**: 339-63. https://doi.org/10.1159/000121808

439. Takahashi Y, Kaba H (2010) Muscarinic receptor type 1 (M1) stimulation, probably through KCNQ/Kv7 channel closure, increases spontaneous GABA release at the dendrodendritic synapse in the mouse accessory olfactory bulb. *Brain Res*. **1339**: 26–40. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.03.104

440. Takigami S (2000) Projection Pattern of Vomeronasal Neurons to the Accessory Olfactory Bulb in Goats. *Chem Senses*. **25**(4): 387-393. https://doi.org/10.1093/chemse/25.4.387

441. Takami S, Fernandez GD, Graziadei PP (1992a) The morphology of GABA-immunoreactive neurons in the accessory olfactory bulb of rats. *Brain Res.* **588**(2): 317-323. https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)91593-4

442. Takami S, Getchell ML, Chen Y, Monti-Bloch L, Berliner DL, Stensaas LJ, Getchell TV (1993) Vomeronasal epithelial cells of the adult human express neuron-specific molecules: *NeuroReport*. **4**(4): 375-378. https://doi.org/10.1097/00001756-199304000-00008

443. Takami S, Getchell ML, Getchell TV (1994) Lectin histochemical localization of galactose, N-acetylgalactosamine, and N-acetylglucosamine in glycoconjugates of the rat vomeronasal organ, with comparison to the olfactory and septal mucosae. *Cell Tissue Res*. **277**: 211-230. https://doi.org/10.1007/BF00327769

444. Takami S, Getchell ML, Getchell TV (1995) Resolution of sensory and mucoid glycoconjugates with terminal α-galactose residues in the mucomicrovillar complex of the vomeronasal sensory epithelium by dual confocal laser scanning microscopy. *Cell Tissue Res.* **280**: 211–216. https://doi.org/10.1007/BF00307791

445. Takami S, Graziadei PP (1990) Morphological complexity of the glomerulus in the rat accessory olfactory bulb: a Golgi study. *Brain Res.* **510**: 339–342. https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91387-V

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

446. Takami S, Graziadei PP (1991) Light microscopic Golgi study of mitral/tufted cells in the accessory olfactory bulb of the adult rat. *J Comp Neurol*. **311**(1): 65–83. https://doi.org/10.1002/cne.903110106

447. Takami S, Graziadei PP, Ichikawa M (1992b) The differential staining patterns of two lectins in the accessory olfactory bulb of the rat. *Brain Res*. **598**(1-2): 337-342. https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90204-M

448. Takigami S, Mori Y, Tanioka Y, Ichikawa M (2004) Morphological evidence for two types of mammalian vomeronasal system. *Chem Senses*. **29**: 301–310. https://doi.org/10.1093/chemse/bjh032

449. Taniguchi K, Mikami S (1985) Fine structure of the epithelia of the vomeronasal organ of horse and cattle: A comparative study. *Cell Tissue Res*. **240**(1): 41-48. https://doi.org/10.1007/BF00217556

450. Taniguchi K, Nii Y, Ogawa K (1993) Subdivisions of the accessory olfactory bulb, as demonstrated by lectin-histochemistry in the golden hamster. *Neurosci Lett*. **158**(2): 185-188. https://doi.org/10.1016/0304-3940(93)90260-R

451. Thibout E, Guillot JF, Ferary S, Limouzin P, Auger J (1995) Origin and identification of bacteria which produce kairomones in the frass of A crolepiopsis asse ctella (Lep., Hyponomeutoidea). *Experientia* **51**: 1073–1075. https://doi.org/10.1007/BF01946919

452. Thiessen DD, Friend HC, Lindzey G (1968) Androgen Control of Territorial Marking in the Mongolian Gerbil. *Science* **160**: 432-434. https://doi.org/10.1126/science.160.3826.432

453. Tian H, Ma M (2004) Molecular organization of the olfactory septal organ. *J Neurosci.* **24**: 8383–8390. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2222-04.2004

454. Tirindelli R (2021) Coding of pheromones by vomeronasal receptors. *Cell Tissue Res.* **383**: 367–386. https://doi.org/10.1007/s00441-020-03376-6

455. Tirindelli R, Mucignat-Caretta C, Ryba NJ (1998) Molecular aspects of pheromonal communication via the vomeronasal organ of mammals. *Trends Neurosci*. **21**(11): 482-6. https://doi.org/10.1016/s0166-2236(98)01274-0

456. Tiwari RP, Ahmed A, Mishra GK (2014) Role of Pheromones and Biostimulation in Animal Reproduction-An Overview. *J Vet Sci Tech*. **3**: 15-20.

457. Tizzano M, Cristofoletti M, Sbarbati A, Finger TE (2011) Expression of taste receptors in Solitary Chemosensory Cells of rodent airways. *BMC Pulm Med.* **11**: 3. https://doi.org/10.1186/1471-2466-11-3.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

458. Tomiyasu J, Kondoh D, Sakamoto H, Matsumoto N, Sasaki M, Kitamura N, Haneda S, Matsui M (2017) Morphological and histological features of the vomeronasal organ in the brown bear. *J Anat.* **231**(5): 749-757. https://doi.org/10.1111/joa.12673

459. Tomiyasu J, Korzekwa A, Kawai YK, Robstad CA, Rosell F, Kondoh D (2022) The vomeronasal system in semiaquatic beavers. *J Anat*. **241**(3): 809-819. https://doi.org/10.1111/joa.13671

460. Torres MV, Ortiz-Leal I, Ferreiro A, Rois JL, Sanchez-Quinteiro P (2022b). Neuroanatomical and immunohistological study of the main and accessory olfactory bulbs of the meerkat (*Suricata suricatta*). *Animals*. **12**(1): 91. https://doi.org/10.3390/ani12010091

461. Torres MV, Ortiz-Leal I, Villamayor PR, Ferreiro A, Rois JL, Sánchez-Quinteiro P (2020) The vomeronasal system of the newborn capybara: A morphological and immunohistochemical study. *Sci Rep*. **10**: 13304. https://doi.org/10.1038/s41598-020-69994-w

462. Torres MV, Ortiz-Leal I, Villamayor PR, Ferreiro A, Rois JL, Sánchez-Quinteiro P (2022a) Does a third intermediate model for the vomeronasal processing of information exist? Insights from the macropodid neuroanatomy. *Brain Struct Funct*. **227**(3): 881-899. https://doi.org/10.1007/s00429-021-02425-2

463. Trinh K, Storm DR (2003) Vomeronasal organ detects odorants in absence of signaling through main olfactory epithelium. *Nat Neurosci.* **6**: 519-255. https://doi.org/10.1038/nn1039

464. Trotier D (2011) Vomeronasal organ and human pheromones. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*. **128**(4): 184-190. https://doi.org/10.1016/j.anorl.2010.11.008

465. Trotier D, Eloit C, Wassef M, Talmain G, Bensimon JL, Døving KB, Ferrand J (2000) The vomeronasal cavity in adult humans. *Chem Senses*. **25**: 369–380. https://doi.org/10.1093/chemse/25.4.369

466. Tschanz B, Meyer-Holzapfel M, Bachmann S (1970) Das Informationssystem bei Braunbaren. *Z. Tierpsychol* **27**: 47-72. https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.1970.tb01860.x

467. Vaccarezza OL, Sepich LN, Tramezzani JH (1981) The vomeronasal organ of the rat. *J Anat.* **132**(Pt 2): 167.

468. Valverde F, López-Mascaraque L, De Carlos JA (1989) Structure of the nucleus olfactorius anterior of the hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *J Comp Neurol.* **279**(4): 581–600. https://doi.org/10.1002/cne.902790407

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

469. Vandenbergh JG (1969) Male odor accelerates female sexual maturation in mice. *Endocrinology*. **84**: 658–660. https://doi.org/10.1210/endo-84-3-658

470. Vassar R, Chao SK, Sitcheran R, Nuñez JM, Vosshall LB, Axel R (1994) Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell*. **79**(6): 981-91. https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90029-9

471. Vedin V, Eriksson B, Berghard A (2010) Organization of the chemosensory neuroepithelium of the vomeronasal organ of the Scandinavian moose *Alces alces*. *Brain Res.* **1306**: 53-61. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.10.012

472. Verhaagen J, Oestreicher AB, Gispen WH, Margolis FL (1989) The expression of the growth associated protein B50/GAP43 in the olfactory system of neonatal and adult rats. *J Neurosci.* **9**: 683-91. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.09-02-00683.1989

473. Veron G, Colyn M, Dunham AE, Taylor P, Gaubert P (2004) Molecular systematics and origin of sociality in mongooses (Herpestidae, Carnivora). *Mol Phylogenet Evol.* **30**(3): 582-598. https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00229-X

474. Viereck C, Tucker RP, Matus A (1989) The adult rat olfactory system expresses microtubule-associated proteins found in the developing brain. *J Neurosci*. **9**: 3547–3557. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.09-10-03547.1989

475. Villamayor PR, Cifuentes JM, Fdz-de-Trocóniz P, Sanchez-Quinteiro P (2018) Morphological and immunohistochemical study of the rabbit vomeronasal organ. *J Anat.* **233**(6): 814–827. https://doi.org/10.1111/joa.12884

476. Villamayor PR, Cifuentes JM, Quintela L, Barcia R, Sanchez-Quinteiro P (2020) Structural, morphometric and immunohistochemical study of the rabbit accessory olfactory bulb. *Brain Struct Funct.* **225**: 203–226. https://doi.org/10.1007/s00429-019-01997-4

477. Villamayor PR, Gullón J, Quintela L, Sánchez-Quinteiro P, Martínez P, Robledo D (2022) Sex separation unveils the functional plasticity of the vomeronasal organ in rabbits. *Front Mol Neurosci*. **15**: 1034254. https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.1034254

478. Villamayor PR, Robledo D, Fernández C, Gullón J, Quintela L, Sánchez-Quinteiro P, Martínez P (2021) Analysis of the vomeronasal organ transcriptome reveals variable gene expression depending on age and function in rabbits. *Genomics* **113**: 2240-2252. https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.05.007

479. Wagner L, Oliyarnyk O, Gartner W, Nowotny P, Groeger M, Kaserer K, Waldhäusl W, Pasternack MS (2000) Cloning and expression of secretagogin, a novel neuroendocrine- and pancreatic islet of Langerhans-specific Ca2+-binding protein. *J Biol Chem*. **275**(32): 24740-51. https://doi.org/10.1074/jbc.M001974200

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

480. Wakabayashi Y, Iwata E, Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y (2000) Regional differences of pheromone production in the sebaceous glands of castrated goats treated with testosterone. *J Vet Med Sci.* **62**: 1067-1072. https://doi.org/10.1292/jvms.62.1067

481. Wang G, Shi P, Zhu Z, Zhang YP (2010) More Functional V1R Genes Occur in Nest-Living and Nocturnal Terricolous Mammals. *Genoma Biol Evol.* **2**: 277–283. https://doi.org/10.1093/gbe/evq020

482. Wang H, Wang J, Yang C, He Y (2021) Histological structure of the vomeronasal organ and accessory olfactory bulb and the seasonal changes of olfactory bulb c-Fos expression in *Spermophilus dauricus*. *Acta Theriol Sin.* **41**(6): 685. https://doi.org/10.16829/j.slxb.150483

483. Wang R, Jiang S, Gu R (1994) Immunohistochemical study of the olfactory mucosa and vomeronasal organ in rat, guinea pig and human fetus. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi*. **29**(1): 23-26.

484. Weiler E, Apfelbach R, Farbman AI (1999) The vomeronasal organ of the male ferret. *Chem Senses*. **24**(2): 127-136. https://doi.org/10.1093/chemse/24.2.127

485. Weiler E, Farbman AI (2003) The septal organ of the rat during postnatal development. *Chem Senses.* **28**(7): 581–593. https://doi.org/10.1093/chemse/bjg047

486. Weissburg MJ, Ferner MC, Pisut DP, Smee DL (2002) Ecological Consequences of Chemically Mediated Prey Perception. *J Chem Ecol.* **28**: 1953–1970. https://doi.org/10.1023/A:1020741710060

487. Weldon PJ (1980) In defense of "kairomone" as a class of chemical releasing stimuli. *J Chem Ecol.* **6**: 719–725. https://doi.org/10.1007/BF00987681

488. Weruaga E, Briñón JG, Porteros A, Arévalo R, Aijón J, Alonso JR (2001) A sexually dimorphic group of atypical glomeruli in the mouse olfactory bulb. *Chem Senses*. **26**(1): 7-15. https://doi.org/10.1093/chemse/26.1.7

489. Wettschureck N, Offermanns S (2005) Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev*. **85**(4): 1159-204. https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2005

490. Whitten WK (1956) Modification of the oestrous cycle of the mouse by external stimuli associated with the male. *J Endocrinol.* **13**: 399-404. https://doi.org/10.1677/joe.0.0130399

491. Willey TJ (1973) The ultrastructure of the cat olfactory bulb. *J Comp Neurol*. **152**: 211–232. https://doi.org/10.1002/cne.901520302

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

492. Wilson EO (1965) Chemical Communication in the Social Insects. *Science* **149**: 1064-1071. https://doi.org/10.1126/science.149.3688.1064

493. Wilson EO (1970) Chemical communication within animal species. *Chem Ecol.*

494. Winans SS, Scalia F (1970) Amygdaloid nucleus: new afferent input from the vomeronasal organ. *Science*. **170**(3955): 330-2. https://doi.org/10.1126/science.170.3955.330

495. Wirant SC, Halvorsen KT, McGuire B (2007) Preliminary observations on the urinary behaviour of female Jack Russell Terriers in relation to stage of the oestrous cycle, location, and age. *Anim Behav Sci.* **85**: 335-348. https://doi.org/10.1016/j.applanim.2006.07.005

496. Wittmer C, Nowack C (2017) Epithelial crypts: A complex and enigmatic olfactory organ in African and South American lungfish (Lepidosireniformes, Dipnoi). *J Morphol.* **278**(6): 791-800. https://doi.org/10.1002/jmor.20673

497. Wöhrmann-Repenning A (1984a) Phylogenetische Aspekte zur Topographie der Jacobsonschen Organe und der Ductus nasopalatini bei Insectivora, Primates, Tupaia und Didelphis [Phylogenetic aspects of the Jacobson's organ and nasopalatine duct topography in insectivores, primates, Tupaia and Didelphis]. *Anat Anz.* **157**(2): 137–149.

498. Wöhrmann-Repenning A (1984b) Vergleichend anatomische Untersuchungen am Vomeronasalkomplex und am rostralen Gaumen verschiedener Mammalia. Teil I. *Gegenbaurs Morph Jahrb.* **130**: 501-530.

499. Woo CC, Leon M (1995) Distribution and development of β-adrenergic receptors in the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol*. **352**(1): 1-10. https://doi.org/10.1002/cne.903520102

500. Wood WF (1983) Chemical Ecology: Chemical Communication in Nature. *J Chem Educ.* **60**: 531. https://doi.org/10.1021/ed060p531

501. Wöhrmann-Repenning A (1991) Functional aspects of the vomeronasal complex in mammals. *Zool Jb Anat*. **121**: 71–80.

502. Wyatt TD (2003) Pheromones and animal behaviour. Communication by smell and taste. *University of Oxford.*

503. Wyatt TD (2010) Pheromones and Behavior. Chapter 2. Chemical Communication in Crustaceans. *Springer*. https://doi.org/10.1007/978-0-387-77101-4_2

504. Wysocki CJ (1979) Neurobehavioral evidence for the involvement of the vomeronasal system in mammalian reproduction. *Neurosci Biobehav Rev.* **3**(4): 301-341. https://doi.org/10.1016/0149-7634(79)90015-0

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

505. Wysocki CJ, Wellington JL, Beauchamp GK (1980) Access of urinary nonvolatiles to the mammalian vomeronasal organ. *Science* **207**: 781-783. https://doi.org/10.1126/science.7352288

506. Yager JA, Hunter DB, Wilson MR, Allen OB (1988) A source of cutaneous maternal semiochemicals in the mink. *Experientia* **44**: 79–81. https://doi.org/10.1007/BF01960256

507. Yang W, Choi Y, Park C, Lee KH, Ahn M, Kang W, Heo SD, Kim J, Shin T (2021) Histological and lectin histochemical studies in the vomeronasal organ of the Korean black goat, *Capra hircus coreanae*. *Acta Histochem*. **123**(2): 151684. https://doi.org/10.1016/j.acthis.2021.151684

508. Yohe LR, Krell NT (2023) An updated synthesis of and outstanding questions in the olfactory and vomeronasal systems in bats: Genetics asks questions only anatomy can answer. *Anat Rec.* https://doi.org/10.1002/ar.25290

509. Yokosuka M (2012) Histological properties of the glomerular layer in the mouse accessory olfactory bulb. *Exp Anim*. **61**(1): 13-24. https://doi.org/10.1538/expanim.61.13

510. Young JM, Trask BJ (2007) V2R gene families degenerated in primates, dog and cow, but expanded in opossum. *Trends Genet.* **23**(5): 212-215. https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.03.004

511. Xu Z, Stoddart DM, Ding H, Zhang J (1995) Self-anointing behavior in the rice-field rat, *Rattus rattoides. J Mammal.* **76**: 1238–1241. https://doi.org/10.2307/1382617

512. Záborszky L, Carlsen J, Brashear HR, Heimer L (1986) Cholinergic and GABAergic afferents to the olfactory bulb in the rat with special emphasis on the projection neurons in the nucleus of the horizontal limb of the diagonal band. *J Comp Neurol*. **243**(4): 488-509. https://doi.org/10.1002/cne.902430405

513. Zancanaro C (2014) Vomeronasal Organ. *Neurobiology of Chemical Communication.*

514. Zapiec B, Mombaerts P (2020). The Zonal Organization of Odorant Receptor Gene Choice in the Main Olfactory Epithelium of the Mouse. *Cell Rep.* **30**(12): 4220–4234.e5. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.110

515. Zhang S, Wu M, Peng C, Zhao G, Gu R (2017) GFAP expression in injured astrocytes in rats. *Exp Ther Med*. **14**(3): 1905-1908. https://doi.org/10.3892/etm.2017.4760

516. Zhang X, Firestein S (2002) The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. *Nat Neurosci.* **5**: 124–133. https://doi.org/10.1038/nn800

517. Zheng LM, Ravel N, Jourdan F (1987) Topography of centrifugal acetylcholinesterase-positive fibres in the olfactory bulb of the rat: Evidence for original

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

projections in atypical glomeruli. *Neuroscience*. **23**: 1083–1093. https://doi.org/10.1016/0306-4522(87)90183-7

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

8 ANEXO I

PERMISOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CCC Marketplace

Order Number: 1377765
Order Date: 20 Jul 2023

Payment Information

Pablo Sanchez-Quinteiro
pablo.sanchez@usc.es
Payment method: Invoice

Billing Address:
Pablo Sanchez-Quinteiro
University of Santiago de Comp ostela
Faculty of Veterinary Sciences of Lugo
Lugo
Spain

+34 686451087
pablo.sanchez@usc.es

Customer Location:
Pablo Sanchez-Quinteiro
University of Santiago de Comp ostela
Faculty of Veterinary Sciences of Lugo
Lugo
Spain

Order Details

1. Journal of experimental biology

Billing Status: Open

Article: Structure and function of the vomeronasal organ.

Order License ID	1377765-1	**Type of Use**	Republish in a thesis/dissertation
Order detail status	Completed	**Publisher**	COMPANY OF BIOLOGISTS LTD.
ISSN	1477-9145	**Portion**	Image/photo/illustration

0,00 EUR
Republication Permission

LICENSED CONTENT

Publication Title	Journal of experimental biology	**Publication Type**	e-Journal
Article Title	Structure and function of the vomeronasal organ.	**Start Page**	2913
Author/Editor	Company of Biologists.	**End Page**	2925
Date	01/01/1930	**Issue**	Pt 21
Language	English	**Volume**	201
Country	United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland	**URL**	http://jeb.biologists.org/
Rightsholder	The Company of Biologists Ltd.		

REQUEST DETAILS

Portion Type	Image/photo/illustration	**Distribution**	Worldwide
Number of Images / Photos / Illustrations	1	**Translation**	Original language of publication
Format (select all that apply)	Electronic	**Copies for the Disabled?**	No
		Minor Editing Privileges?	No
Who Will Republish the Content?	Academic institution	**Incidental Promotional Use?**	No
Duration of Use	Current edition and up to 5 years	**Currency**	EUR
Lifetime Unit Quantity	Up to 999		
Rights Requested	Main product		

NEW WORK DETAILS

Title	Comparative Neuroanatomical Study of the Vomeronasal Organ and Accessory Olfactory Bulb in Wildlife. Analysis of their Morphofunctional Diversity using Immunohistochemical Techniques and Lectin-based Glycoconjugate Recognition	**Institution Name**	University of Santiago de Compostela
		Expected Presentation Date	2023-07-31
Instructor Name	Dr. Pablo Sanchez-Quinteiro		

ADDITIONAL DETAILS

The Requesting Person/Organization to Appear on the License	Mateo V. Torres

REQUESTED CONTENT DETAILS

Title, Description or Numeric Reference of the Portion(s)	Figure 2	**Title of the Article/Chapter the Portion Is From**	Structure and function of the vomeronasal organ.
		Author of Portion(s)	Døving, K B; Trotier, D
Editor of Portion(s)	Døving, K B; Trotier, D	**Issue, if Republishing an Article From a Serial**	Pt 21
Volume / Edition	201		
Page or Page Range of Portion	2913-2925	**Publication Date of Portion**	1998-11-01

The Company of Biologists Ltd. Terms and Conditions

The acknowledgement should state "Reproduced / adapted with permission" and give the source journal name. The acknowledgement should either provide full citation details or refer to the relevant citation in the article reference list. The full citation details should include authors, journal, year, volume, issue and page citation. Where appearing online or in other electronic media, a link should be provided to the original article (e.g. via DOI): Development: dev.biologists.org Disease Models & Mechanisms: dmm.biologists.org Journal of Cell Science: jcs.biologists.org The Journal of Experimental Biology: jeb.biologists.org

Total Items: 1

Subtotal: 0,00 EUR

Order Total: 0,00 EUR

Marketplace Permissions General Terms and Conditions

The following terms and conditions ("General Terms"), together with any applicable Publisher Terms and Conditions, govern User's use of Works pursuant to the Licenses granted by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") on behalf of the applicable Rightsholders of such Works through CCC's applicable Marketplace transactional licensing services (each, a "Service").

1) **Definitions.** For purposes of these General Terms, the following definitions apply:

"License" is the licensed use the User obtains via the Marketplace platform in a particular licensing transaction, as set forth in the Order Confirmation.

"Order Confirmation" is the confirmation CCC provides to the User at the conclusion of each Marketplace transaction. "Order Confirmation Terms" are additional terms set forth on specific Order Confirmations not set forth in the General Terms that can include terms applicable to a particular CCC transactional licensing service and/or any Rightsholder-specific terms.

"Rightsholder(s)" are the holders of copyright rights in the Works for which a User obtains licenses via the Marketplace platform, which are displayed on specific Order Confirmations.

"Terms" means the terms and conditions set forth in these General Terms and any additional Order Confirmation Terms collectively.

"User" or "you" is the person or entity making the use granted under the relevant License. Where the person accepting the Terms on behalf of a User is a freelancer or other third party who the User authorized to accept the General Terms on the User's behalf, such person shall be deemed jointly a User for purposes of such Terms.

"Work(s)" are the copyright protected works described in relevant Order Confirmations.

2) **Description of Service.** CCC's Marketplace enables Users to obtain Licenses to use one or more Works in accordance with all relevant Terms. CCC grants Licenses as an agent on behalf of the copyright rightsholder identified in the relevant Order Confirmation.

3) **Applicability of Terms.** The Terms govern User's use of Works in connection with the relevant License. In the event of any conflict between General Terms and Order Confirmation Terms, the latter shall govern. User acknowledges that Rightsholders have complete discretion whether to grant any permission, and whether to place any limitations on any grant, and that CCC has no right to supersede or to modify any such discretionary act by a Rightsholder.

4) **Representations; Acceptance.** By using the Service, User represents and warrants that User has been duly authorized by the User to accept, and hereby does accept, all Terms.

5) **Scope of License; Limitations and Obligations.** All Works and all rights therein, including copyright rights, remain the sole and exclusive property of the Rightsholder. The License provides only those rights expressly set forth in the terms and conveys no other rights in any Works

6) **General Payment Terms.** User may pay at time of checkout by credit card or choose to be invoiced. If the User chooses to be invoiced, the User shall: (i) remit payments in the manner identified on specific invoices, (ii) unless otherwise specifically stated in an Order Confirmation or separate written agreement, Users shall remit payments upon receipt of the relevant invoice from CCC, either by delivery or notification of availability of the invoice via the Marketplace platform, and (iii) if the User does not pay the invoice within 30 days of receipt, the User may incur a service charge of 1.5% per month or the maximum rate allowed by applicable law, whichever is less. While User may exercise the rights in the License immediately upon receiving the Order Confirmation, the License is automatically revoked and is null and void, as if it had never been issued, if CCC does not receive complete payment on a timely basis.

7) **General Limits on Use.** Unless otherwise provided in the Order Confirmation, any grant of rights to User (i) involves only the rights set forth in the Terms and does not include subsequent or additional uses, (ii) is non-exclusive and non-transferable, and (iii) is subject to any and all limitations and restrictions (such as, but not limited to, limitations on duration of use or circulation) included in the Terms. Upon completion of the licensed use as set forth in the Order Confirmation, User shall either secure a new permission for further use of the Work(s) or immediately cease any new use of the Work(s) and shall render inaccessible (such as by deleting or by removing or severing links or other locators) any further copies of the Work. User may only make alterations to the Work if and as expressly set forth in the Order Confirmation. No Work may be used in any way that is unlawful, including without limitation if such use would violate applicable sanctions laws or regulations, would be defamatory, violate the rights of third parties (including such third parties' rights of copyright, privacy, publicity, or other tangible or intangible property), or is otherwise illegal, sexually explicit, or obscene. In addition, User may not conjoin a Work with any other material that may result in damage to the reputation of the Rightsholder. Any unlawful use will render any licenses hereunder null and void. User agrees to inform CCC if it becomes aware of any infringement of any rights in a Work and to cooperate with any reasonable request of CCC or the Rightsholder in connection therewith.

8) **Third Party Materials.** In the event that the material for which a License is sought includes third party materials (such as photographs, illustrations, graphs, inserts and similar materials) that are identified in such material as having been used by permission (or a similar indicator), User is responsible for identifying, and seeking separate licenses (under this Service, if available, or otherwise) for any of such third party materials; without a separate license, User may not use such third party materials via the License.

9) **Copyright Notice.** Use of proper copyright notice for a Work is required as a condition of any License granted under the Service. Unless otherwise provided in the Order Confirmation, a proper copyright notice will read substantially as follows: "Used with permission of [Rightsholder's name], from [Work's title, author, volume, edition number and year of copyright]; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc." Such notice must be provided in a reasonably legible font size and must be placed either on a cover page or in another location that any person, upon gaining access to the material which is the subject of a permission, shall see, or in the case of republication Licenses, immediately adjacent to the Work as used (for example, as part of a by-line or footnote) or in the place where substantially all other credits or notices for the new work containing the republished Work are located. Failure to include the required notice results in loss to the Rightsholder and CCC, and the User shall be liable to pay liquidated damages for each such failure equal to twice the use fee specified in the Order Confirmation, in addition to the use fee itself and any other fees and charges specified.

10) **Indemnity.** User hereby indemnifies and agrees to defend the Rightsholder and CCC, and their respective employees and directors, against all claims, liability, damages, costs, and expenses, including legal fees and expenses, arising out of any use of a Work beyond the scope of the rights granted herein and in the Order Confirmation, or any use of a Work which has been altered in any unauthorized way by User, including claims of defamation or infringement of rights of copyright, publicity, privacy, or other tangible or intangible property.

11) **Limitation of Liability.** UNDER NO CIRCUMSTANCES WILL CCC OR THE RIGHTSHOLDER BE LIABLE FOR ANY DIRECT, INDIRECT, CONSEQUENTIAL, OR INCIDENTAL DAMAGES (INCLUDING WITHOUT LIMITATION DAMAGES FOR LOSS OF BUSINESS PROFITS OR INFORMATION, OR FOR BUSINESS INTERRUPTION) ARISING OUT OF THE USE OR INABILITY TO USE A WORK, EVEN IF ONE OR BOTH OF THEM HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. In any event, the total liability of the Rightsholder and CCC (including their respective employees and directors) shall not exceed the total amount actually paid by User for the relevant License. User assumes full liability for the actions and omissions of its principals, employees, agents, affiliates, successors, and assigns.

12) **Limited Warranties.** THE WORK(S) AND RIGHT(S) ARE PROVIDED "AS IS." CCC HAS THE RIGHT TO GRANT TO USER THE RIGHTS GRANTED IN THE ORDER CONFIRMATION DOCUMENT. CCC AND THE RIGHTSHOLDER DISCLAIM ALL OTHER WARRANTIES RELATING TO THE WORK(S) AND RIGHT(S), EITHER EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING WITHOUT LIMITATION IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. ADDITIONAL RIGHTS MAY BE REQUIRED TO USE ILLUSTRATIONS, GRAPHS, PHOTOGRAPHS, ABSTRACTS, INSERTS, OR OTHER PORTIONS OF THE WORK (AS OPPOSED TO THE ENTIRE WORK) IN A MANNER CONTEMPLATED BY USER; USER UNDERSTANDS AND AGREES THAT NEITHER CCC NOR THE RIGHTSHOLDER MAY HAVE SUCH ADDITIONAL RIGHTS TO GRANT.

13) **Effect of Breach.** Any failure by User to pay any amount when due, or any use by User of a Work beyond the scope of the License set forth in the Order Confirmation and/or the Terms, shall be a material breach of such License. Any breach not cured within 10 days of written notice thereof shall result in immediate termination of such License without further notice. Any unauthorized (but licensable) use of a Work that is terminated immediately upon notice thereof may be liquidated by payment of the Rightsholder's ordinary license price therefor; any unauthorized (and unlicensable) use that is not terminated immediately for any reason (including, for example, because materials containing the Work cannot reasonably be recalled) will be subject to all remedies available at law or in equity, but in

no event to a payment of less than three times the Rightsholder's ordinary license price for the most closely analogous licensable use plus Rightsholder's and/or CCC's costs and expenses incurred in collecting such payment.

14) **Additional Terms for Specific Products and Services.** If a User is making one of the uses described in this Section 14, the additional terms and conditions apply:

a) ***Print Uses of Academic Course Content and Materials (photocopies for academic coursepacks or classroom handouts).*** For photocopies for academic coursepacks or classroom handouts the following additional terms apply:

i) The copies and anthologies created under this License may be made and assembled by faculty members individually or at their request by on-campus bookstores or copy centers, or by off-campus copy shops and other similar entities.

ii) No License granted shall in any way: (i) include any right by User to create a substantively non-identical copy of the Work or to edit or in any other way modify the Work (except by means of deleting material immediately preceding or following the entire portion of the Work copied) (ii) permit "publishing ventures" where any particular anthology would be systematically marketed at multiple institutions.

iii) Subject to any Publisher Terms (and notwithstanding any apparent contradiction in the Order Confirmation arising from data provided by User), any use authorized under the academic pay-per-use service is limited as follows:

A) any License granted shall apply to only one class (bearing a unique identifier as assigned by the institution, and thereby including all sections or other subparts of the class) at one institution;

B) use is limited to not more than 25% of the text of a book or of the items in a published collection of essays, poems or articles;

C) use is limited to no more than the greater of (a) 25% of the text of an issue of a journal or other periodical or (b) two articles from such an issue;

D) no User may sell or distribute any particular anthology, whether photocopied or electronic, at more than one institution of learning;

E) in the case of a photocopy permission, no materials may be entered into electronic memory by User except in order to produce an identical copy of a Work before or during the academic term (or analogous period) as to which any particular permission is granted. In the event that User shall choose to retain materials that are the subject of a photocopy permission in electronic memory for purposes of producing identical copies more than one day after such retention (but still within the scope of any permission granted), User must notify CCC of such fact in the applicable permission request and such retention shall constitute one copy actually sold for purposes of calculating permission fees due; and

F) any permission granted shall expire at the end of the class. No permission granted shall in any way include any right by User to create a substantively non-identical copy of the Work or to edit or in any other way modify the Work (except by means of deleting material immediately preceding or following the entire portion of the Work copied).

iv) Books and Records; Right to Audit. As to each permission granted under the academic pay-per-use Service, User shall maintain for at least four full calendar years books and records sufficient for CCC to determine the numbers of copies made by User under such permission. CCC and any representatives it may designate shall have the right to audit such books and records at any time during User's ordinary business hours, upon two days' prior notice. If any such audit shall determine that User shall have underpaid for, or underreported, any photocopies sold or by three percent (3%) or more, then User shall bear all the costs of any such audit; otherwise, CCC shall bear the costs of any such audit. Any amount determined by such audit to have been underpaid by User shall immediately be paid to CCC by User, together with interest thereon at the rate of 10% per annum from the date such amount was originally due. The provisions of this paragraph shall survive the termination of this License for any reason.

b) ***Digital Pay-Per-Uses of Academic Course Content and Materials (e-coursepacks, electronic reserves, learning management systems, academic institution intranets).*** For uses in e-coursepacks, posts in electronic reserves, posts in learning management systems, or posts on academic institution intranets, the following additional terms apply:

i) The pay-per-uses subject to this Section 14(b) include:

A) **Posting e-reserves, course management systems, e-coursepacks for text-based content,** which grants authorizations to import requested material in electronic format, and allows electronic access to this material to members of a designated college or university class, under the direction of an instructor designated by the college or university, accessible only under appropriate electronic controls (e.g., password);

B) **Posting e-reserves, course management systems, e-coursepacks for material consisting of photographs or other still images not embedded in text,** which grants not only the authorizations described in Section 14(b)(i)(A) above, but also the following authorization: to include the requested material in course materials for use consistent with Section 14(b)(i)(A) above, including any necessary resizing, reformatting or modification of the resolution of such requested material (provided that such modification does not alter the underlying editorial content or meaning of the requested material, and provided that the resulting modified content is used solely within the scope of, and in a manner consistent with, the particular authorization described in the Order Confirmation and the Terms), but not including any other form of manipulation, alteration or editing of the requested material;

C) **Posting e-reserves, course management systems, e-coursepacks or other academic distribution for audiovisual content,** which grants not only the authorizations described in Section 14(b)(i)(A) above, but also the following

authorizations: (i) to include the requested material in course materials for use consistent with Section 14(b)(i)(A) above; (ii) to display and perform the requested material to such members of such class in the physical classroom or remotely by means of streaming media or other video formats; and (iii) to "clip" or reformat the requested material for purposes of time or content management or ease of delivery, provided that such “clipping” or reformatting does not alter the underlying editorial content or meaning of the requested material and that the resulting material is used solely within the scope of, and in a manner consistent with, the particular authorization described in the Order Confirmation and the Terms. Unless expressly set forth in the relevant Order Conformation, the License does not authorize any other form of manipulation, alteration or editing of the requested material.

ii) Unless expressly set forth in the relevant Order Confirmation, no License granted shall in any way: (i) include any right by User to create a substantively non-identical copy of the Work or to edit or in any other way modify the Work (except by means of deleting material immediately preceding or following the entire portion of the Work copied or, in the case of Works subject to Sections 14(b)(1)(B) or (C) above, as described in such Sections) (ii) permit "publishing ventures" where any particular course materials would be systematically marketed at multiple institutions.

iii) Subject to any further limitations determined in the Rightsholder Terms (and notwithstanding any apparent contradiction in the Order Confirmation arising from data provided by User), any use authorized under the electronic course content pay-per-use service is limited as follows:

A) any License granted shall apply to only one class (bearing a unique identifier as assigned by the institution, and thereby including all sections or other subparts of the class) at one institution;

B) use is limited to not more than 25% of the text of a book or of the items in a published collection of essays, poems or articles;

C) use is limited to not more than the greater of (a) 25% of the text of an issue of a journal or other periodical or (b) two articles from such an issue;

D) no User may sell or distribute any particular materials, whether photocopied or electronic, at more than one institution of learning;

E) electronic access to material which is the subject of an electronic-use permission must be limited by means of electronic password, student identification or other control permitting access solely to students and instructors in the class;

F) User must ensure (through use of an electronic cover page or other appropriate means) that any person, upon gaining electronic access to the material, which is the subject of a permission, shall see:

- a proper copyright notice, identifying the Rightsholder in whose name CCC has granted permission,
- a statement to the effect that such copy was made pursuant to permission,
- a statement identifying the class to which the material applies and notifying the reader that the material has been made available electronically solely for use in the class, and
- a statement to the effect that the material may not be further distributed to any person outside the class, whether by copying or by transmission and whether electronically or in paper form, and User must also ensure that such cover page or other means will print out in the event that the person accessing the material chooses to print out the material or any part thereof.

G) any permission granted shall expire at the end of the class and, absent some other form of authorization, User is thereupon required to delete the applicable material from any electronic storage or to block electronic access to the applicable material.

iv) Uses of separate portions of a Work, even if they are to be included in the same course material or the same university or college class, require separate permissions under the electronic course content pay-per-use Service. Unless otherwise provided in the Order Confirmation, any grant of rights to User is limited to use completed no later than the end of the academic term (or analogous period) as to which any particular permission is granted.

v) Books and Records; Right to Audit. As to each permission granted under the electronic course content Service, User shall maintain for at least four full calendar years books and records sufficient for CCC to determine the numbers of copies made by User under such permission. CCC and any representatives it may designate shall have the right to audit such books and records at any time during User's ordinary business hours, upon two days' prior notice. If any such audit shall determine that User shall have underpaid for, or underreported, any electronic copies used by three percent (3%) or more, then User shall bear all the costs of any such audit; otherwise, CCC shall bear the costs of any such audit. Any amount determined by such audit to have been underpaid by User shall immediately be paid to CCC by User, together with interest thereon at the rate of 10% per annum from the date such amount was originally due. The provisions of this paragraph shall survive the termination of this license for any reason.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

c) ***Pay-Per-Use Permissions for Certain Reproductions (Academic photocopies for library reserves and interlibrary loan reporting) (Non-academic internal/external business uses and commercial document delivery).*** The License expressly excludes the uses listed in Section (c)(i)-(v) below (which must be subject to separate license from the applicable Rightsholder) for: academic photocopies for library reserves and interlibrary loan reporting; and non-academic internal/external business uses and commercial document delivery.

i) electronic storage of any reproduction (whether in plain-text, PDF, or any other format) other than on a transitory basis;

ii) the input of Works or reproductions thereof into any computerized database;

iii) reproduction of an entire Work (cover-to-cover copying) except where the Work is a single article;

iv) reproduction for resale to anyone other than a specific customer of User;

v) republication in any different form. Please obtain authorizations for these uses through other CCC services or directly from the rightsholder.

Any license granted is further limited as set forth in any restrictions included in the Order Confirmation and/or in these Terms.

d) ***Electronic Reproductions in Online Environments (Non-Academic-email, intranet, internet and extranet).*** For "electronic reproductions", which generally includes e-mail use (including instant messaging or other electronic transmission to a defined group of recipients) or posting on an intranet, extranet or Intranet site (including any display or performance incidental thereto), the following additional terms apply:

i) Unless otherwise set forth in the Order Confirmation, the License is limited to use completed within 30 days for any use on the Internet, 60 days for any use on an intranet or extranet and one year for any other use, all as measured from the "republication date" as identified in the Order Confirmation, if any, and otherwise from the date of the Order Confirmation.

ii) User may not make or permit any alterations to the Work, unless expressly set forth in the Order Confirmation (after request by User and approval by Rightsholder); provided, however, that a Work consisting of photographs or other still images not embedded in text may, if necessary, be resized, reformatted or have its resolution modified without additional express permission, and a Work consisting of audiovisual content may, if necessary, be "clipped" or reformatted for purposes of time or content management or ease of delivery (provided that any such resizing, reformatting, resolution modification or “clipping” does not alter the underlying editorial content or meaning of the Work used, and that the resulting material is used solely within the scope of, and in a manner consistent with, the particular License described in the Order Confirmation and the Terms.

15) **Miscellaneous.**

a) User acknowledges that CCC may, from time to time, make changes or additions to the Service or to the Terms, and that Rightsholder may make changes or additions to the Rightsholder Terms. Such updated Terms will replace the prior terms and conditions in the order workflow and shall be effective as to any subsequent Licenses but shall not apply to Licenses already granted and paid for under a prior set of terms.

b) Use of User-related information collected through the Service is governed by CCC's privacy policy, available online at www.copyright.com/about/privacy-policy/.

c) The License is personal to User. Therefore, User may not assign or transfer to any other person (whether a natural person or an organization of any kind) the License or any rights granted thereunder; provided, however, that, where applicable, User may assign such License in its entirety on written notice to CCC in the event of a transfer of all or substantially all of User's rights in any new material which includes the Work(s) licensed under this Service.

d) No amendment or waiver of any Terms is binding unless set forth in writing and signed by the appropriate parties, including, where applicable, the Rightsholder. The Rightsholder and CCC hereby object to any terms contained in any writing prepared by or on behalf of the User or its principals, employees, agents or affiliates and purporting to govern or otherwise relate to the License described in the Order Confirmation, which terms are in any way inconsistent with any Terms set forth in the Order Confirmation, and/or in CCC's standard operating procedures, whether such writing is prepared prior to, simultaneously with or subsequent to the Order Confirmation, and whether such writing appears on a copy of the Order Confirmation or in a separate instrument.

e) The License described in the Order Confirmation shall be governed by and construed under the law of the State of New York, USA, without regard to the principles thereof of conflicts of law. Any case, controversy, suit, action, or proceeding arising out of, in connection with, or related to such License shall be brought, at CCC's sole discretion, in any federal or state court located in the County of New York, State of New York, USA, or in any federal or state court whose geographical jurisdiction covers the location of the Rightsholder set forth in the Order Confirmation. The parties expressly submit to the personal jurisdiction and venue of each such federal or state court.

Last updated October 2022

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CCC Marketplace

Order Number: 1378798
Order Date: 24 Jul 2023

Payment Information

Pablo Sanchez-Quinteiro
pablo.sanchez@usc.es
Payment method: Invoice

Billing Address:
Pablo Sanchez-Quinteiro
University of Santiago de Comp ostela
Faculty of Veterinary Sciences of Lugo
Lugo
Spain

+34 686451087
pablo.sanchez@usc.es

Customer Location:
Pablo Sanchez-Quinteiro
University of Santiago de Comp ostela
Faculty of Veterinary Sciences of Lugo
Lugo
Spain

Order Details

1. Annual review of physiology

Billing Status: Open

Article: Mammalian pheromones.

Order License ID	1378798-1	**Type of Use**	Republish in a thesis/dissertation
Order detail status	Completed	**Publisher**	ANNUAL REVIEWS
ISSN	0066-4278	**Portion**	Image/photo/illustration

0,00 EUR
Republication Permission

LICENSED CONTENT

Publication Title	Annual review of physiology	**Rightsholder**	Annual Reviews, Inc.
Article Title	Mammalian pheromones.	**Publication Type**	Journal
Author/Editor	ANNUAL REVIEWS, INC., AMERICAN PHYSIOLOGICAL SOCIETY (1887-), Luck, James Murray, Hall, Victor Ernest	**Start Page**	151
		End Page	175
		Issue	1
Date	01/01/1939	**Volume**	76
Language	English		
Country	United States of America		

REQUEST DETAILS

Portion Type	Image/photo/illustration	**Distribution**	Worldwide
Number of Images / Photos / Illustrations	1	**Translation**	Original language of publication
Format (select all that apply)	Electronic	**Copies for the Disabled?**	No
		Minor Editing Privileges?	No
Who Will Republish the Content?	Academic institution	**Incidental Promotional Use?**	No
Duration of Use	Life of current edition	**Currency**	EUR
Lifetime Unit Quantity	Up to 499		
Rights Requested	Main product		

NEW WORK DETAILS

Title	Comparative Neuroanatomical Study of the Vomeronasal Organ and Accessory Olfactory Bulb in Wildlife. Analysis of their Morphofunctional Diversity using Immunohistochemical Techniques and Lectin-based Glycoconjugate Recognition	**Institution Name**	University of Santiago de Compostela
		Expected Presentation Date	2023-07-29
Instructor Name	Dr. Pablo Sanchez-Quinteiro		

ADDITIONAL DETAILS

The Requesting Person/Organization to Appear on the License	Mateo V. Torres

REQUESTED CONTENT DETAILS

Title, Description or Numeric Reference of the Portion(s)	Figure 1	**Title of the Article/Chapter the Portion Is From**	Mammalian pheromones.
		Author of Portion(s)	Liberles, Stephen D.
Editor of Portion(s)	Liberles, Stephen D.	**Issue, if Republishing an Article From a Serial**	1
Volume / Edition	76		
Page or Page Range of Portion	151-175	**Publication Date of Portion**	2014-02-10

Total Items: 1

Subtotal: 0,00 EUR

Order Total: 0,00 EUR

Marketplace Permissions General Terms and Conditions

The following terms and conditions ("General Terms"), together with any applicable Publisher Terms and Conditions, govern User's use of Works pursuant to the Licenses granted by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") on behalf of the applicable Rightsholders of such Works through CCC's applicable Marketplace transactional licensing services (each, a "Service").

1) **Definitions.** For purposes of these General Terms, the following definitions apply:

"License" is the licensed use the User obtains via the Marketplace platform in a particular licensing transaction, as set forth in the Order Confirmation.

"Order Confirmation" is the confirmation CCC provides to the User at the conclusion of each Marketplace transaction. "Order Confirmation Terms" are additional terms set forth on specific Order Confirmations not set forth in the General Terms that can include terms applicable to a particular CCC transactional licensing service and/or any Rightsholder-specific terms.

"Rightsholder(s)" are the holders of copyright rights in the Works for which a User obtains licenses via the Marketplace platform, which are displayed on specific Order Confirmations.

"Terms" means the terms and conditions set forth in these General Terms and any additional Order Confirmation Terms collectively.

"User" or "you" is the person or entity making the use granted under the relevant License. Where the person accepting the Terms on behalf of a User is a freelancer or other third party who the User authorized to accept the General Terms on the User's behalf, such person shall be deemed jointly a User for purposes of such Terms.

"Work(s)" are the copyright protected works described in relevant Order Confirmations.

2) **Description of Service.** CCC's Marketplace enables Users to obtain Licenses to use one or more Works in accordance with all relevant Terms. CCC grants Licenses as an agent on behalf of the copyright rightsholder identified in the relevant Order Confirmation.

3) **Applicability of Terms.** The Terms govern User's use of Works in connection with the relevant License. In the event of any conflict between General Terms and Order Confirmation Terms, the latter shall govern. User acknowledges that Rightsholders have complete discretion whether to grant any permission, and whether to place any limitations on any grant, and that CCC has no right to supersede or to modify any such discretionary act by a Rightsholder.

4) **Representations; Acceptance.** By using the Service, User represents and warrants that User has been duly authorized by the User to accept, and hereby does accept, all Terms.

5) **Scope of License; Limitations and Obligations.** All Works and all rights therein, including copyright rights, remain the sole and exclusive property of the Rightsholder. The License provides only those rights expressly set forth in the terms and conveys no other rights in any Works

6) **General Payment Terms.** User may pay at time of checkout by credit card or choose to be invoiced. If the User chooses to be invoiced, the User shall: (i) remit payments in the manner identified on specific invoices, (ii) unless otherwise specifically stated in an Order Confirmation or separate written agreement, Users shall remit payments upon receipt of the relevant invoice from CCC, either by delivery or notification of availability of the invoice via the Marketplace platform, and (iii) if the User does not pay the invoice within 30 days of receipt, the User may incur a service charge of 1.5% per month or the maximum rate allowed by applicable law, whichever is less. While User may exercise the rights in the License immediately upon receiving the Order Confirmation, the License is automatically revoked and is null and void, as if it had never been issued, if CCC does not receive complete payment on a timely basis.

7) **General Limits on Use.** Unless otherwise provided in the Order Confirmation, any grant of rights to User (i) involves only the rights set forth in the Terms and does not include subsequent or additional uses, (ii) is non-exclusive and non-transferable, and (iii) is subject to any and all limitations and restrictions (such as, but not limited to, limitations on duration of use or circulation) included in the Terms. Upon completion of the licensed use as set forth in the Order Confirmation, User shall either secure a new permission for further use of the Work(s) or immediately cease any new use of the Work(s) and shall render inaccessible (such as by deleting or by removing or severing links or other locators) any further copies of the Work. User may only make alterations to the Work if and as expressly set forth in the Order Confirmation. No Work may be used in any way that is unlawful, including without limitation if such use would violate applicable sanctions laws or regulations, would be defamatory, violate the rights of third parties (including such third parties' rights of copyright, privacy, publicity, or other tangible or intangible property), or is otherwise illegal, sexually explicit, or obscene. In addition, User may not conjoin a Work with any other material that may result in damage to the reputation of the Rightsholder. Any unlawful use will render any licenses hereunder null and void. User agrees to inform CCC if it becomes aware of any infringement of any rights in a Work and to cooperate with any reasonable request of CCC or the Rightsholder in connection therewith.

8) **Third Party Materials.** In the event that the material for which a License is sought includes third party materials (such as photographs, illustrations, graphs, inserts and similar materials) that are identified in such material as having been used by permission (or a similar indicator), User is responsible for identifying, and seeking separate licenses (under this Service, if available, or otherwise) for any of such third party materials; without a separate license, User may not use such third party materials via the License.

9) **Copyright Notice.** Use of proper copyright notice for a Work is required as a condition of any License granted under the Service. Unless otherwise provided in the Order Confirmation, a proper copyright notice will read substantially as follows: "Used with permission of [Rightsholder's name], from [Work's title, author, volume, edition number and year of copyright]; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc." Such notice must be provided in a reasonably legible font size and must be placed either on a cover page or in another location that any person, upon gaining access to the material which is the subject of a permission, shall see, or in the case of republication Licenses, immediately adjacent to the Work as used (for example, as part of a by-line or footnote) or in the place where substantially all other credits or notices for the new work containing the republished Work are located. Failure to include the required notice results in loss to the Rightsholder and CCC, and the User shall be liable to pay liquidated damages for each such failure equal to twice the use fee specified in the Order Confirmation, in addition to the use fee itself and any other fees and charges specified.

10) **Indemnity.** User hereby indemnifies and agrees to defend the Rightsholder and CCC, and their respective employees and directors, against all claims, liability, damages, costs, and expenses, including legal fees and expenses, arising out of any use of a Work beyond the scope of the rights granted herein and in the Order Confirmation, or any use of a Work which has been altered in any unauthorized way by User, including claims of defamation or infringement of rights of copyright, publicity, privacy, or other tangible or intangible property.

11) **Limitation of Liability.** UNDER NO CIRCUMSTANCES WILL CCC OR THE RIGHTSHOLDER BE LIABLE FOR ANY DIRECT, INDIRECT, CONSEQUENTIAL, OR INCIDENTAL DAMAGES (INCLUDING WITHOUT LIMITATION DAMAGES FOR LOSS OF BUSINESS PROFITS OR INFORMATION, OR FOR BUSINESS INTERRUPTION) ARISING OUT OF THE USE OR INABILITY TO USE A WORK, EVEN IF ONE OR BOTH OF THEM HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. In any event, the total liability of the Rightsholder and CCC (including their respective employees and directors) shall not exceed the total amount actually paid by User for the relevant License. User assumes full liability for the actions and omissions of its principals, employees, agents, affiliates, successors, and assigns.

12) **Limited Warranties.** THE WORK(S) AND RIGHT(S) ARE PROVIDED "AS IS." CCC HAS THE RIGHT TO GRANT TO USER THE RIGHTS GRANTED IN THE ORDER CONFIRMATION DOCUMENT. CCC AND THE RIGHTSHOLDER DISCLAIM ALL OTHER WARRANTIES RELATING TO THE WORK(S) AND RIGHT(S), EITHER EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING WITHOUT LIMITATION IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. ADDITIONAL RIGHTS MAY BE REQUIRED TO USE ILLUSTRATIONS, GRAPHS, PHOTOGRAPHS, ABSTRACTS, INSERTS, OR OTHER PORTIONS OF THE WORK (AS OPPOSED TO THE ENTIRE WORK) IN A MANNER CONTEMPLATED BY USER; USER UNDERSTANDS AND AGREES THAT NEITHER CCC NOR THE RIGHTSHOLDER MAY HAVE SUCH ADDITIONAL RIGHTS TO GRANT.

13) **Effect of Breach.** Any failure by User to pay any amount when due, or any use by User of a Work beyond the scope of the License set forth in the Order Confirmation and/or the Terms, shall be a material breach of such License. Any breach not cured within 10 days of written notice thereof shall result in immediate termination of such License without further notice. Any unauthorized (but licensable) use of a Work that is terminated immediately upon notice thereof may be liquidated by payment of the Rightsholder's ordinary license price therefor; any unauthorized (and unlicensable) use that is not terminated immediately for any reason (including, for example, because materials containing the Work cannot reasonably be recalled) will be subject to all remedies available at law or in equity, but in no event to a payment of less than three times the Rightsholder's ordinary license price for the most closely analogous licensable use plus Rightsholder's and/or CCC's costs and expenses incurred in collecting such payment.

14) **Additional Terms for Specific Products and Services.** If a User is making one of the uses described in this Section 14, the additional terms and conditions apply:

a) ***Print Uses of Academic Course Content and Materials (photocopies for academic coursepacks or classroom handouts).*** For photocopies for academic coursepacks or classroom handouts the following additional terms apply:

i) The copies and anthologies created under this License may be made and assembled by faculty members individually or at their request by on-campus bookstores or copy centers, or by off-campus copy shops and other similar entities.

ii) No License granted shall in any way: (i) include any right by User to create a substantively non-identical copy of the Work or to edit or in any other way modify the Work (except by means of deleting material immediately preceding or following the entire portion of the Work copied) (ii) permit "publishing ventures" where any particular anthology would be systematically marketed at multiple institutions.

iii) Subject to any Publisher Terms (and notwithstanding any apparent contradiction in the Order Confirmation arising from data provided by User), any use authorized under the academic pay-per-use service is limited as follows:

A) any License granted shall apply to only one class (bearing a unique identifier as assigned by the institution, and thereby including all sections or other subparts of the class) at one institution;

B) use is limited to not more than 25% of the text of a book or of the items in a published collection of essays, poems or articles;

C) use is limited to no more than the greater of (a) 25% of the text of an issue of a journal or other periodical or (b) two articles from such an issue;

D) no User may sell or distribute any particular anthology, whether photocopied or electronic, at more than one institution of learning;

E) in the case of a photocopy permission, no materials may be entered into electronic memory by User except in order to produce an identical copy of a Work before or during the academic term (or analogous period) as to which any particular permission is granted. In the event that User shall choose to retain materials that are the subject of a photocopy permission in electronic memory for purposes of producing identical copies more than one day after such retention (but still within the scope of any permission granted), User must notify CCC of such fact in the applicable permission request and such retention shall constitute one copy actually sold for purposes of calculating permission fees due; and

F) any permission granted shall expire at the end of the class. No permission granted shall in any way include any right by User to create a substantively non-identical copy of the Work or to edit or in any other way modify the Work (except by means of deleting material immediately preceding or following the entire portion of the Work copied).

iv) Books and Records; Right to Audit. As to each permission granted under the academic pay-per-use Service, User shall maintain for at least four full calendar years books and records sufficient for CCC to determine the numbers of copies made by User under such permission. CCC and any representatives it may designate shall have the right to audit such books and records at any time during User's ordinary business hours, upon two days' prior notice. If any such audit shall determine that User shall have underpaid for, or underreported, any photocopies sold or by three percent (3%) or more, then User shall bear all the costs of any such audit; otherwise, CCC shall bear the costs of any such audit. Any amount determined by such audit to have been underpaid by User shall immediately be paid to CCC by User, together with interest thereon at the rate of 10% per annum from the date such amount was originally due. The provisions of this paragraph shall survive the termination of this License for any reason.

b) ***Digital Pay-Per-Uses of Academic Course Content and Materials (e-coursepacks, electronic reserves, learning management systems, academic institution intranets).*** For uses in e-coursepacks, posts in electronic reserves, posts in learning management systems, or posts on academic institution intranets, the following additional terms apply:

i) The pay-per-uses subject to this Section 14(b) include:

A) **Posting e-reserves, course management systems, e-coursepacks for text-based content,** which grants authorizations to import requested material in electronic format, and allows electronic access to this material to members of a designated college or university class, under the direction of an instructor designated by the college or university, accessible only under appropriate electronic controls (e.g., password);

B) **Posting e-reserves, course management systems, e-coursepacks for material consisting of photographs or other still images not embedded in text,** which grants not only the authorizations described in Section 14(b)(i)(A) above, but also the following authorization: to include the requested material in course materials for use consistent with Section 14(b)(i)(A) above, including any necessary resizing, reformatting or modification of the resolution of such requested material (provided that such modification does not alter the underlying editorial content or meaning of the requested material, and provided that the resulting modified content is used solely within the scope of, and in a manner consistent with, the particular authorization described in the Order Confirmation and the Terms), but not including any other form of manipulation, alteration or editing of the requested material;

C) **Posting e-reserves, course management systems, e-coursepacks or other academic distribution for audiovisual content,** which grants not only the authorizations described in Section 14(b)(i)(A) above, but also the following authorizations: (i) to include the requested material in course materials for use consistent with Section 14(b)(i)(A) above; (ii) to display and perform the requested material to such members of such class in the physical classroom or remotely by means of streaming media or other video formats; and (iii) to "clip" or reformat the requested material for purposes of time or content management or ease of delivery, provided that such “clipping” or reformatting does not alter the underlying editorial content or meaning of the requested material and that the resulting material is used solely within the scope of, and in a manner consistent with, the particular authorization described in the Order Confirmation and the Terms.

Unless expressly set forth in the relevant Order Conformation, the License does not authorize any other form of manipulation, alteration or editing of the requested material.

ii) Unless expressly set forth in the relevant Order Confirmation, no License granted shall in any way: (i) include any right by User to create a substantively non-identical copy of the Work or to edit or in any other way modify the Work (except by means of deleting material immediately preceding or following the entire portion of the Work copied or, in the case of Works subject to Sections 14(b)(1)(B) or (C) above, as described in such Sections) (ii) permit "publishing ventures" where any particular course materials would be systematically marketed at multiple institutions.

iii) Subject to any further limitations determined in the Rightsholder Terms (and notwithstanding any apparent contradiction in the Order Confirmation arising from data provided by User), any use authorized under the electronic course content pay-per-use service is limited as follows:

A) any License granted shall apply to only one class (bearing a unique identifier as assigned by the institution, and thereby including all sections or other subparts of the class) at one institution;

B) use is limited to not more than 25% of the text of a book or of the items in a published collection of essays, poems or articles;

C) use is limited to not more than the greater of (a) 25% of the text of an issue of a journal or other periodical or (b) two articles from such an issue;

D) no User may sell or distribute any particular materials, whether photocopied or electronic, at more than one institution of learning;

E) electronic access to material which is the subject of an electronic-use permission must be limited by means of electronic password, student identification or other control permitting access solely to students and instructors in the class;

F) User must ensure (through use of an electronic cover page or other appropriate means) that any person, upon gaining electronic access to the material, which is the subject of a permission, shall see:

- a proper copyright notice, identifying the Rightsholder in whose name CCC has granted permission,
- a statement to the effect that such copy was made pursuant to permission,
- a statement identifying the class to which the material applies and notifying the reader that the material has been made available electronically solely for use in the class, and
- a statement to the effect that the material may not be further distributed to any person outside the class, whether by copying or by transmission and whether electronically or in paper form, and User must also ensure that such cover page or other means will print out in the event that the person accessing the material chooses to print out the material or any part thereof.

G) any permission granted shall expire at the end of the class and, absent some other form of authorization, User is thereupon required to delete the applicable material from any electronic storage or to block electronic access to the applicable material.

iv) Uses of separate portions of a Work, even if they are to be included in the same course material or the same university or college class, require separate permissions under the electronic course content pay-per-use Service. Unless otherwise provided in the Order Confirmation, any grant of rights to User is limited to use completed no later than the end of the academic term (or analogous period) as to which any particular permission is granted.

v) Books and Records; Right to Audit. As to each permission granted under the electronic course content Service, User shall maintain for at least four full calendar years books and records sufficient for CCC to determine the numbers of copies made by User under such permission. CCC and any representatives it may designate shall have the right to audit such books and records at any time during User's ordinary business hours, upon two days' prior notice. If any such audit shall determine that User shall have underpaid for, or underreported, any electronic copies used by three percent (3%) or more, then User shall bear all the costs of any such audit; otherwise, CCC shall bear the costs of any such audit. Any amount determined by such audit to have been underpaid by User shall immediately be paid to CCC by User, together with interest thereon at the rate of 10% per annum from the date such amount was originally due. The provisions of this paragraph shall survive the termination of this license for any reason.

c) ***Pay-Per-Use Permissions for Certain Reproductions (Academic photocopies for library reserves and interlibrary loan reporting) (Non-academic internal/external business uses and commercial document delivery).*** The License expressly excludes the uses listed in Section (c)(i)-(v) below (which must be subject to separate license from the applicable Rightsholder) for: academic photocopies for library reserves and interlibrary loan reporting; and non-academic internal/external business uses and commercial document delivery.

i) electronic storage of any reproduction (whether in plain-text, PDF, or any other format) other than on a transitory basis;

ii) the input of Works or reproductions thereof into any computerized database;

iii) reproduction of an entire Work (cover-to-cover copying) except where the Work is a single article;

iv) reproduction for resale to anyone other than a specific customer of User;

v) republication in any different form. Please obtain authorizations for these uses through other CCC services or directly from the rightsholder.

Any license granted is further limited as set forth in any restrictions included in the Order Confirmation and/or in these Terms.

d) ***Electronic Reproductions in Online Environments (Non-Academic-email, intranet, internet and extranet).*** For "electronic reproductions", which generally includes e-mail use (including instant messaging or other electronic transmission to a defined group of recipients) or posting on an intranet, extranet or Intranet site (including any display or performance incidental thereto), the following additional terms apply:

i) Unless otherwise set forth in the Order Confirmation, the License is limited to use completed within 30 days for any use on the Internet, 60 days for any use on an intranet or extranet and one year for any other use, all as measured from the "republication date" as identified in the Order Confirmation, if any, and otherwise from the date of the Order Confirmation.

ii) User may not make or permit any alterations to the Work, unless expressly set forth in the Order Confirmation (after request by User and approval by Rightsholder); provided, however, that a Work consisting of photographs or other still images not embedded in text may, if necessary, be resized, reformatted or have its resolution modified without additional express permission, and a Work consisting of audiovisual content may, if necessary, be "clipped" or reformatted for purposes of time or content management or ease of delivery (provided that any such resizing, reformatting, resolution modification or “clipping” does not alter the underlying editorial content or meaning of the Work used, and that the resulting material is used solely within the scope of, and in a manner consistent with, the particular License described in the Order Confirmation and the Terms.

15) **Miscellaneous.**

a) User acknowledges that CCC may, from time to time, make changes or additions to the Service or to the Terms, and that Rightsholder may make changes or additions to the Rightsholder Terms. Such updated Terms will replace the prior terms and conditions in the order workflow and shall be effective as to any subsequent Licenses but shall not apply to Licenses already granted and paid for under a prior set of terms.

b) Use of User-related information collected through the Service is governed by CCC's privacy policy, available online at www.copyright.com/about/privacy-policy/.

c) The License is personal to User. Therefore, User may not assign or transfer to any other person (whether a natural person or an organization of any kind) the License or any rights granted thereunder; provided, however, that, where applicable, User may assign such License in its entirety on written notice to CCC in the event of a transfer of all or substantially all of User's rights in any new material which includes the Work(s) licensed under this Service.

d) No amendment or waiver of any Terms is binding unless set forth in writing and signed by the appropriate parties, including, where applicable, the Rightsholder. The Rightsholder and CCC hereby object to any terms contained in any writing prepared by or on behalf of the User or its principals, employees, agents or affiliates and purporting to govern or otherwise relate to the License described in the Order Confirmation, which terms are in any way inconsistent with any Terms set forth in the Order Confirmation, and/or in CCC's standard operating procedures, whether such writing is prepared prior to, simultaneously with or subsequent to the Order Confirmation, and whether such writing appears on a copy of the Order Confirmation or in a separate instrument.

e) The License described in the Order Confirmation shall be governed by and construed under the law of the State of New York, USA, without regard to the principles thereof of conflicts of law. Any case, controversy, suit, action, or proceeding arising out of, in connection with, or related to such License shall be brought, at CCC's sole discretion, in any federal or state court located in the County of New York, State of New York, USA, or in any federal or state court whose geographical jurisdiction covers the location of the Rightsholder set forth in the Order Confirmation. The parties expressly submit to the personal jurisdiction and venue of each such federal or state court.

Last updated October 2022

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Date: July 24, 2023

Dear Editor in Chief of Experimental Animals,

I am preparing
Book/Journal: My doctoral thesis (Vol. No.)
Article title: Comparative Neuroanatomical Study of the Vomeronasal Organ and Accessory Olfactory Bulb in Wildlife. Analysis of their Morphofunctional Diversity using Immunohistochemical Techniques and Lectin-based Glycoconjugate Recognition.
Author(s): Mateo Vázquez Torres
Publisher: University of Santiago de Compostela (USC) repository

I will be grateful if you would kindly grant permission to reproduce the following material(s) to be reproduced in the above mentioned article, including paper, digital/electronic and in any online versions of current and all future editions as well as any language translations thereof.

Journal: Experimental Animals (Vol. 61 No. 1)
Page: 13-24
Article title: Histological properties of the glomerular layer in the mouse accessory olfactory bulb
Authors: Yokosuka, Makoto
Figures/Tables/Lines: Figs. 1A, 1D, 1E, 2, 3A, 3B

Full acknowledgement will appear in legends for the figures as follows:
Reproduced with permission of Japanese Association for Laboratory Animal Science from[Yokosuka]. [2012]. [Histological properties of the glomerular layer in the mouse accessory olfactory bulb]. *Exp. Anim.* [61(1)]: [13-24].

To grant permission, please indicate your agreement by signing and returning a copy of this letter, specifying any credit line or other conditions you may require.

Yours sincerely,

Name: Mateo Vázquez Torres

Affiliation: University of Santiago de Compostela (USC)

I grant permission to use the material(s) specified above.

Date: 2023/7/26

Signature S. Takahashi

Editor-in-chief, Experimental Animals

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAMPUS
TERRA

La comunicación química a través de feromonas, mediada por el sistema vomeronasal (SVN), resulta vital para la supervivencia de los mamíferos salvajes. El estudio de este sistema facilitará el desarrollo de técnicas basadas en el empleo de feromonas con el fin de mejorar el bienestar y la reproducción en parques naturales y centros de recuperación. Actualmente, son escasas las especies de mamíferos con un SVN caracterizado morfofuncionalmente, algo esencial para el desarrollo de dichas técnicas de una forma fundada y consistente. El objetivo general de nuestras investigaciones ha sido describir de la forma más exhaustiva posible las características morfológicas, macroscópicas, microscópicas y neuroquímicas de cuatro especies de mamíferos salvajes: el capibara, el ualabí de Bennett, la suricata y la gacela dama.